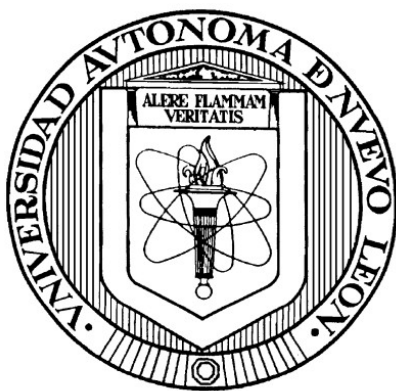


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS EMERGENTES EN CANINOS CON  
GASTROENTERITIS AGUDA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY**

Por

**Armando Busqueta Medina**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

JULIO 2020

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS EMERGENTES EN CANINOS CON  
GASTROENTERITIS AGUDA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY,  
NUEVO LEÓN.**

COMITÉ DE TESIS:



**DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES  
DIRECTORA DE TESIS**



**DR. RAMIRO ÁVALOS RAMÍREZ  
CODIRECTOR DE TESIS**



**DRA. DIANA ELISA ZAMORA ÁVILA  
CODIRECTORA DE TESIS**



**DR. GUSTAVO MORENO DEGOLLADO  
CODIRECTOR DE TESIS**



**DR. JUAN F. CONTRERAS CORDERO  
CODIRECTOR EXTERNO DE TESIS**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS EMERGENTES EN CANINOS CON  
GASTROENTERITIS AGUDA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY,  
NUEVO LEÓN.**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Sibilina Cedillo Rosales.

**DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DR. RAMIRO ÁVALOS RAMÍREZ**

**RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE VIROLOGÍA VETERINARIA, FMVZ,  
UANL.**

## **DEDICATORIA**

Dedicada a mis papás Gloria y Armando que siempre he contado con su apoyo y me han incitado a seguir mis sueños y a superarme siempre.

A mi hermana Lorena que siempre cuento con ella para relajarme y divertirme aún en momentos de estrés.

Para Eduardo y Raúl que han estado conmigo en esta etapa de mi vida dándome consejos, fuerza y mucho cariño para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por recibirme por segunda ocasión para seguir con mi formación como veterinario y el apoyo recibido en estos dos años de posgrado. Agradezco al personal administrativo, en especial a Reyna y a todos los profesores que me compartieron sus conocimientos y experiencias, muchas gracias.

A mi directora de tesis, la Dra. Sibilina Cedillo Rosales, que desde mis estudios de licenciatura logró que encontrara mi pasión por la Biología Molecular, por aceptarme como su asesorado y brindarme todo su apoyo en este posgrado, por siempre le estaré agradecido.

Agradezco a todo mi comité de tesis, especialmente al Dr. Ramiro quien siempre estuvo dispuesto a brindar su apoyo en el laboratorio y por hacernos el trabajo más divertido al contarnos sus anécdotas de vida, a la Dra. Diana que a pesar de su apretada agenda siempre ha tenido tiempo para recibirme, al Dr. Gustavo por el apoyo brindado a la Dra. Sibilina y a mí. también a mi codirector externo el Dr. Juan Francisco, gracias por el apoyo brindado en el congreso de Virología.

A Lesly y Cynthia por apoyarme en los laboratorios de Virología y Genética, desde enseñarme el uso correcto de los equipos hasta las diferentes técnicas realizadas en los laboratorios y también gracias por su amistad.

Por último, a mis compañeros de posgrado Brandon, Irma, Mariana, Mali, Javi, Gerry, Rosaura, Fer, Brandon y Laura que siempre nos apoyamos mutuamente en especial antes de los seminarios, los recordaré a todos con mucho cariño.

Este trabajo de tesis ha sido financiado a través de diversas vías:

Becas Nacionales CONACYT para estudios de Maestría (Posgrado) convocatoria 2018.

Programa de Apoyo y Fortalecimiento de la Investigación (PAFI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, convocatoria 2019.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	3
1.1.1 OBJETIVO GENERAL .....	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.2. HIPÓTESIS .....	4
<b>2. LITERATURA REVISADA.....</b>	<b>5</b>
2.1. CIRCOVIRUS CANINO.....	5
2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CIRCOVIRUS CANINO .....	5
2.1.2. TAXONOMÍA DE CCV .....	8
2.1.3. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CCV.....	8
2.1.4. GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DEL CCV .....	9
2.1.5. MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DEL CCV.....	11
2.1.6. FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR CCV .....	12
2.1.7. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR CCV .....	13



2.2.	BOCAVIRUS CANINO .....	14
2.2.1.	ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE BOCAVIRUS CANINO.....	14
2.2.2.	TAXONOMÍA DE CBoV .....	15
2.2.3.	ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CBoV .....	17
2.2.4.	GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DEL CBoV .....	17
2.2.5.	MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DE CBoV.....	20
2.2.6.	FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR CBoV .....	21
2.2.7.	DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR CBoV.....	22
<b>3.</b>	<b><i>MATERIALES Y MÉTODOS .....</i></b>	<b>24</b>
3.1.	MATERIALES.....	24
3.1.1.	EQUIPOS .....	24
3.1.2.	REACTIVOS, ESTUCHES COMERCIALES Y SOLUCIONES UTILIZADAS.....	25
3.2.	METODOLOGÍA.....	29
3.2.1.	LUGAR DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	29
3.2.2.	ÁREA DE MUESTREO .....	29
3.2.3.	TIPO Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LA MUESTRA .....	30
3.2.4.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE LA MUESTRA.....	31
3.2.5.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	32
3.2.5.1.	Controles positivo y negativo para CCV .....	32
3.2.5.2.	Diseño de oligonucleótidos para el PCR de CCV .....	33
3.2.5.3.	Control positivo y negativo para CBoV .....	34
3.2.5.4.	Diseño de oligonucleótidos para el PCR de CBoV .....	34
3.2.5.5.	Condiciones de la PCR para CCV y CBoV .....	35

3.2.6.	ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS Y DOCUMENTACIÓN DE RESULTADOS .....	37
3.2.7.	PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GEL DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN .....	37
3.2.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	39
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1.	LUGAR DE COLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	41
4.2.	ÁREA DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS .....	41
4.3.	CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS .....	42
4.4.	DISEÑO DE SONDA SINTÉTICA COMO CONTROL POSITIVO PARA PCR DE CCV Y CBoV.....	43
4.5.	PCR Y PCR SEMIANIDADO PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE CIRCOVIRUS CANINO .....	45
4.6.	ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y PCR SEMIANIDADO PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE BOCAVIRUS CANINO TIPO 1 y 2 .....	48
4.7.	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA CIRCOVIRUS CANINO.....	51
4.8.	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA BOCAVIRUS CANINO .....	53
4.9.	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y PRESENTACIÓN DE CO-INFECCIONES.....	59
4.10.	CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CCV Y CBoV Y LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD .....	62
4.11.	RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICOS .....	65
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>FUENTES BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes que se han realizado sobre la distribución y presencia de CCV.....	7
Tabla 2. Reportes que se han realizado sobre la distribución y presencia de CBoV. ....	16
Tabla 3. Consumibles y reactivos del estuche “E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit .....	25
Tabla 4. Contenido del estuche Platinum® PCR SuperMix .....	26
Tabla 5. Consumibles y reactivos del estuche E.Z.N.A. ® Gel Extraction Kit.....	27
Tabla 6. Contenido del estuche QuantiFluor® dsDNA System.....	27
Tabla 7. Número de muestras de este estudio y municipios de procedencia .....	42
Tabla 8. Signología clínica presente en caninos muestreados en el área metropolitana de Monterrey, N.L .....	43
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR semianidado que amplifican un segmento del gen de la proteína Replicasa de Circovirus canino .....	46
Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR semianidado que amplifican un segmento del gen de la proteína NP1 de Bocavirus canino .....	50
Tabla 11. Características generales de los caninos positivos a CCV a través de PCR.....	52
Tabla 12. Características generales de los caninos positivos a CBoV-1 a través de PCR .....	55
Tabla 13. Características generales de los caninos positivos a CBoV-2 a través de PCR .....	58
Tabla 14. Resultados de las muestras procesadas .....	60
Tabla 15. Características y signología de caninos con gastroenteritis en el área metropolitana de Monterrey, N.L. ....	61

<i>Tabla 16. Correlación de las variables cualitativas (signología y muerte de caninos) y la presencia de CBoV-1, CBoV-2 y CCV .....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 17. Correlación entre la signología y mortalidad de la enfermedad en caninos con la presentación de co-infecciones virales.....</i>	<i>65</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática y micrografías electrónicas de viriones de Circovirus..	9
Figura 2. Organización del genoma de Circovirus canino.....	10
Figura 3. Representación gráfica y micrografía electrónica de la estructura de un Bocavirus.....	17
Figura 4. Organización del genoma de Bocavirus canino.....	18
Figura 5. Área de muestreo.....	29
Figura 6. Sonda sintética (control positivo) de CCV, CBoV1-2.....	44
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR y PCR semianidado para Circovirus canino.....	47
Figura 8. Electroforesis de productos de PCR y PCR anidados de Bocavirus canino.....	49
Figura 9. Electroforesis de PCR de un segmento del gen de la proteína CAP del Circovirus canino.....	51
Figura 10. Electroforesis del PCR de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-1.....	53
Figura 11. Electroforesis del PCR semianidado de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-1.....	54
Figura 12. Electroforesis de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-2 amplificado por PCR.....	56
Figura 13. Electroforesis del PCR semianidado de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-2.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje (Porciento)
A	Alanina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico, " <i>Deoxyribonucleic acid</i> "
BPV	<i>Parvovirus bovino</i> " <i>Bovine parvovirus</i> "
° C	Grados centígrados
Cap	Proteína de la cápside de Circovirus
CBoV	<i>Bocavirus canino</i> , " <i>Canine bocavirus</i> "
CCV	<i>Circovirus canino</i> , " <i>Canine circovirus</i> "
CMV	<i>Canine Minute Virus</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPE	Efecto citopático, " <i>Cytopathic effect or cytopathogenic effect</i> "
CPV	<i>Parvovirus canino</i> , " <i>Canine parvovirus</i> "
CS-B	Sulfato de condroitina
C-terminal	Sección carboxi-terminal de una proteína
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitocina-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima, " <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> "
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GAG	Glucosaminoglucano
h	Hora
HBoV-1	<i>Bocavirus humano tipo 1</i> " <i>Human bocavirus type 1</i> "
HCl	Ácido clorhídrico
HS	Heparán sulfato
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
MDCK	Línea celular de riñón de canino, " <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> "
mg	Miligramos
µg	Microgramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, " <i>National Center for Biotechnology Information</i> "

N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
No. Cat.	Número de catálogo
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural, " <i>non-structural protein</i> "
N-terminal	Sección amino terminal de una proteína
ORF	Marco de lectura abierto, " <i>open reading frame</i> "
Ori	Origen de replicación
P	Valor de " <i>p</i> "
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, " <i>Polymerase chain reaction</i> "
PCV-2	<i>Circovirus porcino tipo 2 "Porcine circovirus type 2"</i>
pb	Pares de bases
PK	Proteinasa K
pH	Potencial de hidrógeno
RCR	Replicación en círculo rodante " <i>Rolling circle replication</i> "
Rep	Proteína replicasa de Circovirus
rpm	Revoluciones por minuto
SDHA	Síndrome de Diarrea Hemorrágica Aguda
seg	Segundos
ssADN	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
Tm	Temperatura de fusión " <i>Melting temperature</i> "
U	Unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VP	Proteína de la cápside de Parvovirus/Bocavirus
Xi2	Chi cuadrada

## RESUMEN

La gastroenteritis hemorrágica aguda o síndrome de diarrea hemorrágica aguda es uno de los cuadros clínicos de mayor gravedad y letalidad que se presenta en caninos. La etiología infecciosa es multifactorial asociándose la presencia de *Parvovirus canino*, *Coronavirus canino*, *Rotavirus canino*, *Clostridium perfringens* tipo A y *C. difficile*. Recientemente, se ha descrito la co-actividad de *Circovirus canino* (CCV) y *Bocavirus canino* (CBoV) en el síndrome. A la fecha no existen reportes de estos últimos virus en nuestro país, por lo que el objetivo general de este estudio fue determinar la presencia de *Circovirus canino* (CCV) y *Bocavirus canino* (CBoV) y conocer su relación con la presencia de SDHA en perros con o sin gastroenteritis hemorrágica aguda de la zona metropolitana de Monterrey, N.L. Para ello fueron analizadas 150 muestras de heces de animales sanos y con gastroenteritis hemorrágica, realizando la detección de CCV y CBoV a través de PCR y PCR semianidado, amplificando un fragmento de 393 pb de la proteína de la cápside para CCV, un fragmento de la proteína NP1 de 253 pb para CBoV-1 y para CBoV-2 un fragmento de 215 pb de la proteína NP1. En el presente estudio se detectó la presencia de CCV en el 6.66 % (10/150) de las muestras, en el 14.66 % (22/150) CBoV-1 y en el 10 % (15/150) CBoV-2. Se encontraron además co-infecciones en el 21.33 % (32/150) de las muestras, asociándose los virus objetivo de este estudio con la presencia de CPV-2. Estadísticamente se pudo establecer una correlación significativa entre la presencia de co-infecciones y la presencia de diarrea hemorrágica ( $P= 0.0007$ ), también entre la presencia de co-infecciones y la letalidad de la enfermedad ( $P= 0.0002$ ) en animales que presentaron gastroenteritis hemorrágica. Por lo que podemos concluir en este proyecto de investigación que CCV y CBoV se encuentran circulando en el área metropolitana de Monterrey, N.L., y en co-infecciones con CPV-2 se vieron asociados estadísticamente con la presencia de diarrea hemorrágica y con la muerte de algunos caninos.

**PALABRAS CLAVE:** Circovirus canino (CCV); Bocavirus canino tipo 1 (CBoV-1); Bocavirus canino tipo 2 (CBoV-2); Síndrome de Diarrea Hemorrágica (SDHA).



## ABSTRACT

Acute hemorrhagic gastroenteritis or acute hemorrhagic diarrhea syndrome is one of the most serious and lethal diseases that occurs in canines. The etiology is multifactorial, associating the presence of *Canine Parvovirus*, *Canine Coronavirus*, *Canine Rotavirus*, *Clostridium perfringens type A* and *C. difficile*. Recently, the co-activity of Canine circovirus (CCV) and Canine bocavirus (CBoV) has been described in the syndrome. To date, there are no reports of these latest viruses in our country, so the general objective of this study was to determine the presence of *Canine circovirus* (CCV) and *Canine bocavirus* (CBoV) and its relationship with the presence of SDHA in dogs with or without acute hemorrhagic gastroenteritis in the metropolitan area of Monterrey. For this, 150 samples from healthy and with hemorrhagic gastroenteritis dogs were analyzed, detecting CCV and CBoV through PCR and semi-nested PCR, amplifying a 393 bp fragment of the capsid protein gen for CCV, a fragment of the 253 bp of NP1 protein gen for CBoV-1 and for CBoV-2 a 215 bp fragment of NP1 protein gen. In the present study, the presence of the CCV was detected in 6.6 % (10/150) samples, in 14.6 % (22/150) CBoV-1 and in 10% (15/150) CBoV-2. Coinfections were also found in 21.33% (32/150) of the samples, associating the viruses of this study with the presence of CPV-2. Statistically, a significant correlation could be established between the presence of co-infections and the presence of hemorrhagic diarrhea ( $P = 0.0007$ ), also between the presence of co-infections and the lethality of the disease ( $P = 0.0002$ ) in animals that presented hemorrhagic gastroenteritis. Therefore, we can conclude in this research project that CCV and CBoV are circulating in the metropolitan area of Monterrey, N.L., and in co-infections with CPV, they were statistically associated with the presence of hemorrhagic diarrhea and the death of some canines.

**KEY WORDS:** Canine circovirus (CCV), Canine bocavirus type 1 (CBoV-1), Canine bocavirus type 2 (CboV-2), Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome (AHDS).

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas en caninos son uno de los principales motivos de consulta a veterinarios, los agentes etiológicos más importantes que generan este problema son de tipo parasitario, bacterianos y virales. Estos agentes pueden por si solos generar la sintomatología, pero generalmente se presentan como co-infecciones, lo que genera cuadros entéricos que pueden ocasionar la muerte del canino. La gastroenteritis hemorrágica aguda o síndrome hemorrágico entérico es uno de los cuadros más graves que se presenta en caninos, con un alto porcentaje de letalidad. Se ha descrito a *Clostridium perfringens* tipo A, *C. difficile*, *Parvovirus canino* y recientemente se han detectado co-infecciones de *Parvovirus canino* con *Coronavirus canino*, *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* en estos casos. En la actualidad hay una gran cantidad de virus emergentes en caninos donde la prevalencia, incidencia y patogenicidad no es conocida. Tal es el caso del *Circovirus canino* y *Bocavirus canino*, que por estudios realizados en los últimos años se les ha relacionado junto con otros agentes en los casos de gastroenteritis hemorrágica aguda.

El *Circovirus canino* es un virus descrito hace poco tiempo, investigaciones recientes han relacionado este virus con problemas digestivos en caninos, como diarrea, vómitos, enteritis hemorrágica o hasta la muerte del animal. Este virus pertenece a la familia *Circoviridae* del género *Circovirus* y de la especie *Circovirus canino*. Son viriones desnudos de tamaño entre 15-20 nm, su genoma es una cadena sencilla circular de ácido desoxirribonucleico (ssADN) de cerca de 2 kb.

Junto con los miembros de la familia *Parvoviridae*, son los virus de ADN más pequeños conocidos en vertebrados.

El *Bocavirus canino* es un virus desnudo con genoma de cadena sencilla de ADN de cerca de 5 Kb, pertenece al género *Bocavirus* de la familia *Parvoviridae*. Estos virus han sido relacionados con enfermedades respiratorias e intestinales de animales y humanos. Hasta la fecha han sido 3 especies las que se han detectado en perros con diferentes manifestaciones clínicas (CBoV 1-3).

Recientemente se ha detectado la presencia de *Circovirus canino* en regiones de Italia, USA, Croacia y Tailandia, mientras que el *Bocavirus canino* ha sido encontrado en China, Portugal, Alemania y Corea en casos de gastroenteritis hemorrágica aguda en caninos. Sin embargo, no existen reportes de estos virus en nuestro país.

Es importante determinar los agentes etiológicos que se encuentran presentes en la presentación aguda de gastroenteritis hemorrágica en caninos, ya que en gran manera de ello depende el tratamiento y las medidas de control y prevención que se realicen. Es por eso por lo que el objetivo general de este proyecto de tesis es determinar la presencia de *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* en perros con gastroenteritis hemorrágica aguda en la zona metropolitana de Monterrey. Para ello, se tomarán muestras de heces de mascotas con signos clínicos de gastroenteritis hemorrágica aguda, así como de animales aparentemente sanos de clínicas veterinarias de la zona metropolitana de Monterrey. Las muestras se procesarán y se realizará PCR para la detección molecular de los virus mencionados. Se estima

que los virus estén presentes en las muestras provenientes de mascotas con gastroenteritis hemorrágica aguda, como únicos patógenos causantes de la enfermedad o en co-infecciones con otros patógenos.

## **1.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **1.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* y su relación con la presencia de SDHA en perros sanos y con gastroenteritis hemorrágica aguda en la zona metropolitana de Monterrey.

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Estandarizar la técnica de PCR para la detección de *Circovirus canino* y *Bocavirus canino*.
- b. Determinar el porcentaje de positividad para el *Circovirus canino* de muestras clínicas a partir de caninos con gastroenteritis aguda y sanos del área metropolitana de Monterrey N.L.
- c. Determinar el porcentaje de positividad para el *Bocavirus canino* a partir de muestras clínicas de caninos con gastroenteritis aguda y sanos del área metropolitana de Monterrey N.L.

- d. Establecer si existe una correlación entre la presencia de los virus estudiados y la presentación clínica, la sintomatología y la letalidad de la enfermedad.

## **1.2. HIPÓTESIS**

El *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* se encuentran presentes en la población canina del área metropolitana de Monterrey, N.L., y en co-infecciones con CPV están asociados con la presentación de gastroenteritis hemorrágica aguda.

## **2. LITERATURA REVISADA**

### **2.1. CIRCOVIRUS CANINO**

#### **2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CIRCOVIRUS CANINO**

La primera vez que se identificó el *Circovirus canino* fue en 2012, en muestras de suero de caninos en USA, denominado *Circovirus canino tipo 1*. Usando análisis filogenéticos se determinó que era el primer Circovirus reportado en caninos y estaba relacionado genéticamente con el *Circovirus porcino tipo 2* (Kapoor et al., 2012). Un año después se relacionó la presencia de *Circovirus canino* con la presencia de enfermedad, el virus fue detectado en un canino que presentaba gastroenteritis hemorrágica severa, vasculitis y linfadenitis granulomatosa (McGraw, et al., 2013).

En 2014 en Italia fue identificada la presencia de *Circovirus canino* en un cachorro que murió a causa de una enteritis, donde las pruebas de laboratorio no mostraban evidencia de la presencia de algún otro patógeno (Decaro et al., 2014). Otros estudios investigaron la presencia del virus en canes domésticos, zorros y tejones, dando positivo en algunas muestras (Zaccaria et al., 2016).

Así también, en Taiwán se encontró que el *Circovirus canino* estaba presente en la población de caninos domésticos, donde la tasa más alta de detección del virus fue en muestras provenientes de mascotas con signología de gastroenteritis (Hsu et al., 2016).

Más recientemente, estudios demostraron que podrían aparecer nuevas cepas de *Circovirus canino* por la evidencia de recombinación genética de varios linajes del virus (Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018). En China se realizaron estudios donde se demostró que existe una mayor variación de nucleótidos en el ORF2 entre las secuencias estudiadas, dando a conocer un segundo genotipo de *Circovirus canino* (Yi et al., 2018).

También en Sudamérica han sido reportadas secuencias de *Circovirus canino* que presentan sustituciones de aminoácidos en la región que codifica para la proteína de la cápside (Kotsias et al., 2019). También han sido reportadas en menor frecuencia sustituciones de aminoácidos en la región que codifica para la proteína Replicasa (Kotsias et al., 2019; L. Niu et al., 2020).

Otros estudios mostraron que en la mayoría de los casos el *Circovirus canino* se presenta como co-infección con otro patógeno, siendo el *Parvovirus canino tipo 2* el más frecuente, junto con el *Coronavirus canino* y el *Distemper canino* (Li, McGraw, et al., 2013; Thaiwong, Wise, Maes, Mullaney, & Kiupel, 2016; Zaccaria et al., 2016).

Estudios recientes han analizado la relación que tiene la infección de *Circovirus canino* con la presencia del Síndrome de Diarrea Hemorrágica Aguda (AHDS por sus siglas en inglés). Se encontró que el *Circovirus canino* puede no ser el primer causante de la enfermedad, pero puede que tenga un rol como cofactor negativo en las infecciones de *Parvovirus canino tipo 2* (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017).

La distribución y presencia o prevalencia de CCV es variable, existen pocos reportes de este virus a nivel mundial, sin embargo, ya se ha reportado en algunos países de Europa, Asia y América. La tabla 1 muestra un resumen de la información que se ha publicado sobre este virus.

**Tabla 1. Reportes que se han realizado sobre la distribución y presencia de CCV.**

<b>País de reporte</b>	<b>Virus reportado</b>	<b>Número de muestras utilizadas</b>	<b>Porcentaje de positividad o conclusiones</b>	<b>Fuente de información</b>
EUA	CCV	168 SDHA 204 Sanos	8.8 % Positividad de CCV 68 % Co-infección con otros patógenos	Li et al., 2013
Italia	CCV	1 SDHA	CCV asociado con la presencia de enteritis	Decaro et al., 2014
Taiwán	CCV	207 SDHA 160 Sanos	20 % Positividad de CCV Correlación positiva entre la presencia de CCV y la presencia de diarrea a (P= 0.0002)	Hsu et al., 2016
EUA	CCV	3 SDHA	Co-infecciones de CPV2 y CCV pueden ocasionar un cuadro más severo de enteritis	Thaiwong et al., 2016
Alemania	CCV	55 SDHA 66 Sanos 54 CPV +	6.8 % Positividad de CCV Alta letalidad en co-infecciones con CPV	Anderson et al., 2017
Italia	CCV	219 SDHA 67 Sanos	31 % Positividad de CCV Correlación positiva entre co-infecciones de CCV con otro patógeno y la presencia de gastroenteritis	Dowgier et al., 2017
Argentina	CCV	3 SDHA	CPV2 en co-infección con CCV podría estar asociado con una enteritis fatal	Kotsias, et al., 2019
EUA	CCV	1 SDHA	Presencia de CCV en células de intestino y en macrófagos	Kruiningen et al., 2019
China	CCV	141 SDHA/Sanos	12.8 % Positividad de CCV 100 % Co-infección con CPV en muestras diarreicas	Niu et al., 2020

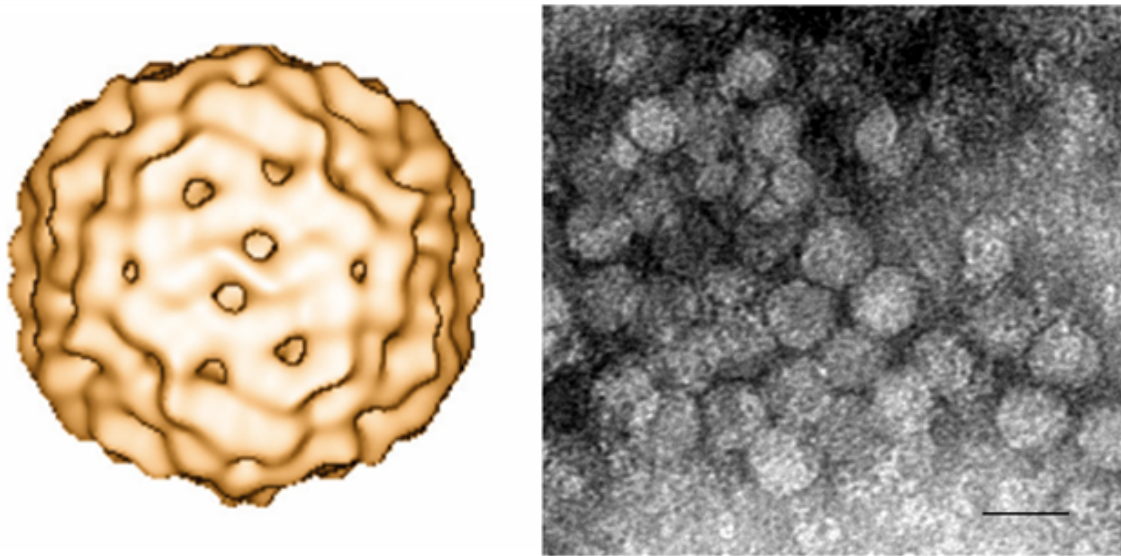


### **2.1.2. TAXONOMÍA DE CCV**

El *Circovirus canino* es un virus perteneciente a la familia *Circoviridae*, esta familia incluye al género *Circovirus*, que agrupa diferentes especies, entre ellas el *Circovirus canino*. Especies del género *Circovirus* se han identificado en mamíferos, aves y peces (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses). Recientemente en China se realizaron análisis filogenéticos de las secuencias que codifican para la proteína de la cápside y se reveló que las secuencias se dividían en dos diferentes grupos, dando así dos genotipos diferentes de *Circovirus canino* (*Circovirus canino tipo 1* y *Circovirus canino tipo 2*) (Yi et al., 2018), sin embargo esta última clasificación aún no está oficialmente determinada por el ICTV.

### **2.1.3. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CCV**

El *Circovirus canino* es un virus pequeño, su tamaño oscila entre 15 y 20nm, no tiene envoltura lipídica y la forma de la cápside es esférica. Poseen como genoma una cadena sencilla de ADN circular (Decaro et al., 2014) protegido por una cápside de proteínas. Se asume que la cápside está compuesta de 60 subunidades de la proteína estructural (Cap) por estudios realizados con virus del mismo género como el *Circovirus porcino tipo 2* y el *Virus de la Enfermedad del Pico y las Plumas*, que presentan una estructura muy similar (Figura 1) (Crowther, Berriman, Curran, Allan, & Todd, 2003).

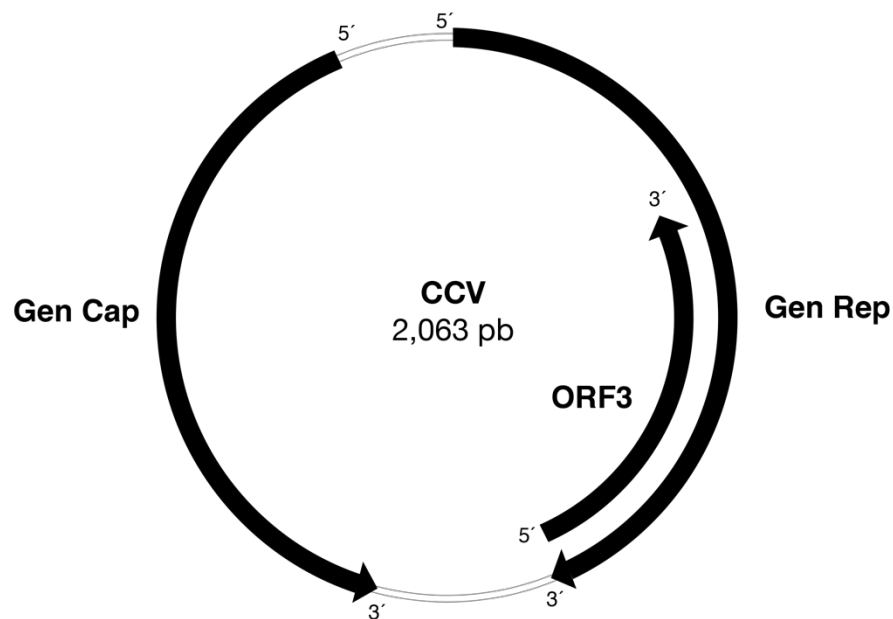


**Figura 1. Representación esquemática y micrografías electrónicas de viriones de *Circovirus*.** (Izq.) Reconstrucción en 3D de PCV-2 por microscopía crioelectrónica. Se ha propuesto un modelo estructural que comprende 60 subunidades ( $T = 1$ ) dispuestas en 12 unidades morfológicas pentaméricas (Crowther et al., 2003). (Der.) Micrografía electrónica de transmisión con tinción negativa de PCV-2 (Carolina Rodríguez-Cariño; Joaquim Segalés, CReSA, España). Barra de escala = 20 nm.

#### **2.1.4. GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DEL CCV**

El genoma del *Circovirus canino* está compuesto por una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico circular (ssADN) de aproximadamente 2kb. El genoma está compuesto por dos marcos de lectura (*Open Reading Frame* por sus siglas en inglés ORF) que codifican para la proteína replicasa (Rep) y la proteína de la cápside (Cap) (A. Kapoor et al., 2012), la organización del genoma se observa en la figura 2. El *Circovirus canino*, al igual que otros miembros de este género, posee dos regiones intergénicas no codificantes entre los ORF's, la región intergénica 5' contiene una región en forma de tallo-bucle termodinámicamente estable para la iniciación de la

replicación (*Origin of replication, Ori*) y una secuencia de 9 nucleótidos característica (TAGTATTAC) donde pueden acoplarse las proteínas de replicación de la célula huésped (A. Kapoor et al., 2012; Li, McGraw, et al., 2013). Se ha descrito un tercer marco de lectura localizado en los nucleótidos 470-889 en antisentido del marco de lectura 1, se cree estar relacionado con la replicación viral y la patogenicidad por estudios realizados con *Circovirus porcino tipo 2* (PCV-2) (Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018).



**Figura 2. Organización del genoma de Circovirus canino.** CCV, Circovirus canino; Cap, gen de la proteína de la cápside; Rep, gen de la proteína replicasa; ORF3, marco de lectura 3 (Modificado de Li, McGraw, et al., 2013)

La proteína Rep está compuesta de 303 aminoácidos y está codificada en el ORF1 (A. Kapoor et al., 2012), es una proteína multifuncional que regula la replicación viral, entre sus diferentes funciones está el reconocimiento del Ori, represión de la

transcripción, iniciar y terminar la síntesis de ADN, e inducir la acumulación de factores de replicación en la célula infectada (Cheung, 2015).

La proteína Cap está compuesta por 270 aminoácidos y está codificada en el ORF2 (A. Kapoor et al., 2012). Esta proteína es la única proteína estructural que tienen los Circovirus, forman la cápside del virus y le dan estabilidad al genoma viral. Estudios realizados con *Circovirus porcino tipo 2* (PCV2), han determinado que la proteína Cap es el componente con más propiedades inmunogénicas del virus (Fort et al., 2010).

#### **2.1.5. MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DEL CCV**

La vía de transmisión del virus más común es la fecal-oral, aunque estudios han demostrado que la transmisión vertical es posible en *Circovirus porcino* (Rose, Opriessnig, Grasland, & Jestin, 2012). Se ha demostrado que los virus del género *Circovirus* pueden resistir pH bajos que lo hace resistente a la acidez del estómago y poder llegar hasta intestino, su órgano destino (Allan & Ellis, 2000).

Uno de los pasos primordiales para la infección viral es la entrada del virus a la célula, mediada por receptores de membrana, para el *Circovirus canino* no se ha descrito todavía que tipo de receptor utiliza, sin embargo, se demostró que PCV2 utiliza glucosaminoglicanos (GAG), heparán sulfato (HS) y sulfato de condroitina (CS-B) para el acoplamiento viral a la célula (Misinzio, Delputte, Meerts, Lefebvre, & Nauwynck, 2006).

Una vez adheridos a la célula, el Circovirus ingresa por endocitosis mediada por receptor y con proteínas de recubrimiento (clatrininas), una proteína libre en citoplasma que se adhiere a la membrana para formar vesículas y permitir la endocitosis en la célula (Nauwynck, 2005).

Después de la infección, se ha demostrado que virus como el PCV2 utilizan los microtúbulos y las dineínas para facilitar su transporte hacia el núcleo, una vez que el virus se libera del endosoma tardío/lisosoma, la subunidad de la proteína Cap se une directamente a la subunidad IC1 de la dineína para viajar de forma retrógrada hacia el núcleo (Cao et al., 2015).

Los Circovirus se replican vía replicación en círculo rodante (rolling circle replication (RCR)), que es llevado a cabo por enzimas expresadas durante la fase S del ciclo celular (Cheung, 2012).

Estudios recientes han demostrado que la proteína de la cápside de PCV2 tiene la habilidad de interactuar con las diferentes señales de muerte celular, ocasionando así el daño en los tejidos infectados (Walia, Dardari, Chaiyakul, & Czub, 2014).

#### **2.1.6. FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR CCV**

Con la información recabada en lo que concierne al *Circovirus canino*, se cree que pueda causar una infección sistémica, aunque hay que tener en cuenta que la información sobre la patogenia del virus en animales domésticos es limitada y requiere futuros estudios.

En 2013 se encontró *Circovirus canino* en el hígado de un canino que presentaba gastroenteritis hemorrágica severa, vasculitis y linfadenitis granulomatosa (Li, McGraw, et al., 2013). También se ha demostrado que el *Circovirus canino* puede causar hepatitis y enteritis hemorrágica (Decaro et al., 2014).

Más comúnmente se ha encontrado la presencia del *Circovirus canino* en conjunto con otros patógenos causando gastroenteritis en caninos (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Thaiwong et al., 2016; Zaccaria et al., 2016).

#### **2.1.7. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR CCV**

Las infecciones por *Circovirus canino* no son diagnosticadas frecuentemente en la práctica clínica, esto se debe a que el virus ha sido reconocido recientemente como un causante de gastroenteritis en caninos, al igual que otros patógenos ya conocidos como *Parvovirus canino*, *Coronavirus canino*, *Distemper canino*, *Rotavirus canino*, entre otros (Caddy, 2018). Estos últimos pueden ser diagnosticados rápidamente en la práctica clínica por medio de ELISAS o inmunocromatografía (Oh et al., 2006).

Sin embargo, a la fecha no existen pruebas rápidas para la detección de *Circovirus canino*, siendo las pruebas moleculares el método de diagnóstico más usado para detectarlo (Caddy, 2018). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplifica regiones específicas del genoma viral. Para la detección molecular de *Circovirus canino*, investigadores han logrado diseñar oligonucleótidos que permite la

amplificación del gen que codifica para la proteína replicasa y también de la proteína de la cápside (Anderson et al., 2017; Li, McGraw, et al., 2013).

Otro método de diagnóstico para la detección del virus es el aislamiento viral, con una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, el proceso requiere de mayor tiempo, de equipo especializado y de personal técnico capacitado para realizar aislamiento y detección del virus en cultivo de células (Sykes, 2014).

## **2.2. BOCAVIRUS CANINO**

### **2.2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE BOCAVIRUS CANINO**

En 1967 se identificó el *Minute virus canino* (*Canine Minute Virus (CMV)*) en Alemania, denominado inicialmente como Parvovirus canino tipo 1 (Decaro, Carmichael, & Buonavoglia, 2012). Fue en EUA donde se reportó la patogenicidad en caninos, causando enfermedades respiratorias en cachorros recién nacidos e infertilidad en adultos (Manteufel & Truyen, 2008). Sin embargo, también existen estudios en Japón donde demuestran que el virus afecta a caninos adultos (Ohshima, Kawakami, Abe, & Mochizuki, 2010).

La segunda especie, el *Bocavirus canino tipo 2* (CBoV-2), fue identificado por primera vez en 2012 en muestras respiratorias de caninos sanos y fallecidos en el estado de Nueva York, EUA (Amit Kapoor et al., 2012). A la fecha, CBoV-2 ha sido detectado en diferentes países ocasionando problemas respiratorios y

gastroentéricos en cachorros (Bodewes et al., 2014; Choi et al., 2015; Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

Por último, se ha identificado una tercera especie de *Bocavirus canino tipo 3* (CBoV-3) en California, EUA, en muestras de hígado de un canino con gastroenteritis hemorrágica severa que difiere genéticamente de los ya conocidos bocavirus en caninos (Li, Pesavento, et al., 2013). En la tabla 2 se muestra un resumen de la información que ha sido publicada sobre CBoV.

### **2.2.2. TAXONOMÍA DE CBoV**

Recientemente se reorganizó la clasificación de la familia *Parvoviridae*, dividiéndose en tres subfamilias, los virus de la subfamilia *Densovirinae*, que afectan principalmente a invertebrados, los de la reciente subfamilia *Hamaparvovirinae*, y la subfamilia *Parvovirinae*, que a su vez se divide en diez géneros: *Amdoparvovirus*, *Artiparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Loriparvovirus*, *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus*. Al género *Bocaparvovirus* pertenecen las tres especies identificadas que afectan a caninos (CBoV 1-3) (Manteufel & Truyen, 2008; Péntzes et al., 2020).

El CBoV-1 inicialmente se conocía como *Minute virus canino* (CMV), cuando se identificaron las nuevas especies de bocavirus en caninos, se propuso cambiarle el nombre a *Bocavirus canino tipo 1* (Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

El CBoV-2 fue identificado años después, tomando en cuenta que la similitud entre las proteínas codificadas NS, NP y VP era de menos de 60% comparadas con las



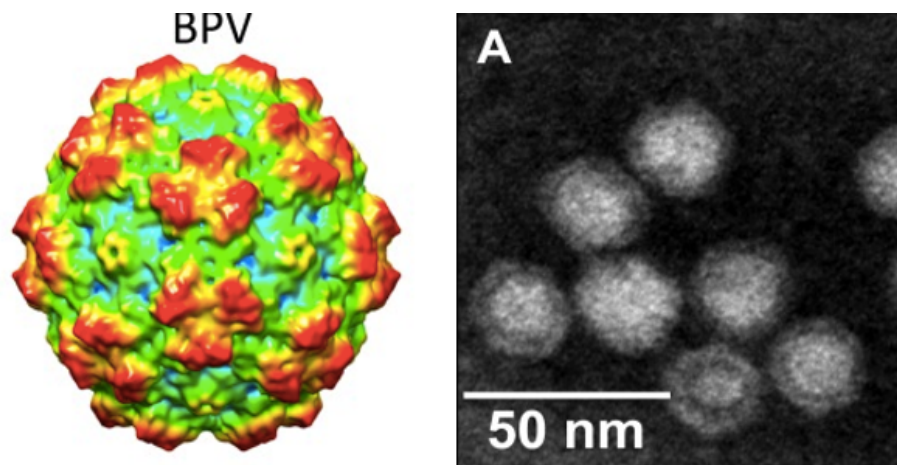
del CBoV-1 (Amit Kapoor et al., 2012). Igualmente sucedió con el CBoV-3, que compartía menos del 50% de similitud con las dos especies de bocavirus antes descubiertos (Li, Pesavento, et al., 2013; Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

**Tabla 2. Reportes que se han realizado sobre la distribución y presencia de CBoV.**

<b>País de reporte</b>	<b>Virus reportado</b>	<b>Número de muestras utilizadas</b>	<b>Porcentaje de positividad o conclusiones</b>	<b>Fuente de información</b>
EUA	CBoV-1	13 SDHA	CBoV-1 puede considerarse patógeno para cachorros	Harrison et al., 1992
EUA	CBoV1	23 (inoculados con CBoV-1)	CBoV-1 puede ocasionar enfermedad inaparente o severa a neonatos	Carmichael et al., 1994
Japón	CBoV-1	3 SDHA	CBoV-1 asociado con gastroenteritis en caninos adultos	Ohshima et al., 2010
Italia	CBoV-1	3 Enf. sistémica	CBoV-1 asociado con la muerte de neonatos	Decaro et al., 2012
EUA	CBoV-2	158	Descubrimiento de la especie CBoV-2 en caninos con problemas respiratorios	Kapoor et al., 2012
EUA	CBoV-3	1 SDHA	Descubrimiento de la especie CBoV-3 en hígado de canino con SDHA	Li et al., 2013
Alemania	CBoV-2	3 SDHA	CBoV-2 puede considerarse como causa de enteritis en cachorros	Bodewes et al., 2014
China	CBoV-2	351 SDHA / Sanos	4.6 % Positividad de CBoV-2	Lau et al., 2012
China	CBoV-2	201 SDHA	7.5 % Positividad de CBoV-2 Alta tasa de co-infección con CPV	Guo et al., 2016
Korea	CBoV-2	83 SDHA	9.6 % Positividad de CBoV-2	Choi et al., 2015
Tailandia	CBoV-2	3 Disnea y hemoptisis	Presencia de CBoV-2 en tejido intestinal	Piewbang et al., 2018

### 2.2.3. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CBoV

El *Bocavirus canino* es un virus pequeño sin envoltura lipídica, su cápside tiene forma icosaédrica. Posee un genoma linear de cadena sencilla de ADN de 5.5 kb (Manteufel & Truyen, 2008). El material genético de los bocavirus está protegido por una cápside de forma icosaédrica compuesta de 60 copias de una combinación de proteínas estructurales (VP's), la familia *Parvoviridae* puede codificar 6 diferentes proteínas estructurales (VP1 – VP6), el género *Bocavirus* codifica para las proteínas VP1 y VP2, en donde VP2 predomina en la estructura de la cápside (Fig. 3) (Gurda et al., 2010).

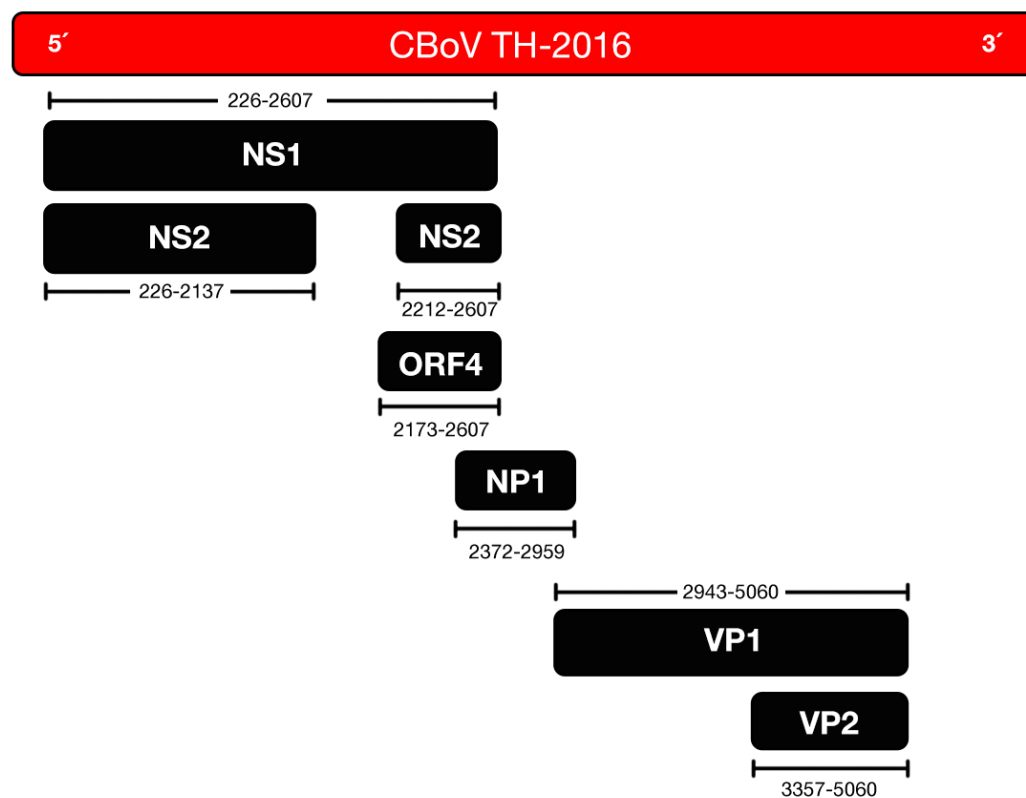


**Figura 3. Representación gráfica y micrografía electrónica de la estructura de un Bocavirus.** (Izq.) Reconstrucción en 3D por microscopía crioelectrónica de Bocavirus. (Der.) Micrografía electrónica de partículas similar a virus de *Parvovirus bovino* teñidas negativamente con un aumento de  $\times 97,000$  (Kailasan et al., 2015).

### 2.2.4. GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DEL CBoV

El genoma de *Bocavirus canino* consiste en una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico lineal (ssADN) de aproximadamente 5.2 kb (Zhai et al., 2017).

Los virus del género *Bocavirus* se caracterizan por tener tres marcos de lectura abiertos, ORF1, ORF2 y ORF3, que codifican para las proteínas NS1, VP1/2 y NP1 respectivamente (Amit Kapoor et al., 2012). Recientemente se ha descrito un cuarto marco de lectura (ORF4), que codifica para una proteína desconocida de 144 aa (Fig. 4) (J. Niu et al., 2019; Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).



**Figura 4. Organización del genoma de Bocavirus canino.** Esquema del genoma de la cepa CBoV-2 TH-2016. Se muestra la localización de los genes NS1 / 2, NP1, ORF4, VP1 / 2 (Modificado de: (Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018)).

La proteína NS1 posee varios dominios con diferentes funciones, la región N-terminal de la proteína tiene función de acoplamiento y endonucleasa, la región C-terminal de la proteína actúa como promotor de la transcripción y la región media funciona como ATPasa y helicasa (Guido et al., 2016). La proteína NS1 es necesaria para la replicación de ADN viral y su expresión (Vanacker et al., 1996). Artículos recientes describen que el *Minute virus canino* genera hasta cinco proteínas NS, formadas por diferentes ARN mensajeros que se generan de la región que codifica la proteína NS (Fasina, Stupps, Figueroa-Cuilan, & Pintel, 2017).

La proteína NP1 es codificada solamente por el género Bocavirus (Amit Kapoor et al., 2012). Esta proteína no estructural regula el procesamiento de ARN suprimiendo la señal interna de poliadenilación localizada a la mitad del genoma, también se ha demostrado que juega un rol importante en la expresión de las proteínas virales de la cápside y está involucrada en la replicación de ADN viral (Fasina et al., 2017; Guido et al., 2016).

Las proteínas estructurales VP1 y VP2 comparten una región C-terminal y VP1 posee una región N-terminal diferente, que contiene un dominio conservado de fosfolipasa A2 (Schwartz, Green, Carmichael, & Parrish, 2002), este tipo de enzimas hidroliza fosfolípidos, generando ácidos grasos libres, se cree que este dominio de la proteína VP1 es esencial para la transferencia del genoma viral del endosoma/lisosoma hacia el núcleo para iniciar la replicación (Qu et al., 2008).

La proteína VP2 es la que más abunda en la conformación de la cápside, proporcionando la forma tridimensional del virus y la estabilidad al genoma viral (Gurda et al., 2010).

#### **2.2.5. MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DE CBoV**

Las vías de entrada del virus son por el tracto respiratorio hacia torrente sanguíneo o por ingestión directa llegando a tracto gastrointestinal (Berns & Parrish, 2013).

La familia *Parvoviridae*, ha evolucionado al punto de secuestrar la funcionalidad de interacción de glucanos para introducirse a la célula durante la infección. El acoplamiento del virus mediado por receptor es de los pasos esenciales para la infección (Huang, Halder, & Agbandje-McKenna, 2015). Estudios con *Parvovirus bovino* (BPV), han demostrado que la cápside de BPV interactúa con una glucoproteína transmembrana de eritrocitos, la glicoforina A (Blackburn, Cline, Hemming, & Johnson, 2005). También se ha reportado que el BPV utiliza el ácido siálico en la superficie de las células para adherirse a la membrana plasmática (Johnson, Fenn, Owens, Faucheux, & Blackburn, 2004). Después de la unión al ácido siálico, el virus entra a la célula por endocitosis mediada por clatrin. El complejo actina-miosina V es responsable del transporte vesicular. La transición de endosoma temprano a tardío es acompañada por una protonación que activa la fosfolipasa A2, hidrolizando los fosfolípidos del endosoma tardío para liberar el virión al citoplasma. El virión se traslada al núcleo por medio de microtúbulos/dineína y

penetra la envoltura nuclear alterando su composición (Dudleenamjil, 2009; Porwal et al., 2013).

*Bocavirus canino*, al igual que BPV, utiliza el modelo de replicación “rolling-hairpin”, donde se generan concatenaros del genoma (Schildgen, Qiu, & Söderlund-Venermo, 2012).

La infección por parvovirus induce la muerte celular mediada por apoptosis o necrosis, ocasionando la pérdida del tejido donde se replica el virus y signos clínicos de la enfermedad (Yun Chen & Qiu, 2011).

#### **2.2.6. FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR CBoV**

Las diferentes especies de *Bocavirus canino* pueden llegar a desarrollar patologías diversas, sin embargo, comúnmente se relacionan con enfermedades respiratorias y/o digestivos (J. Niu et al., 2019).

El *Minute virus canino* (CBoV-1) puede ocasionar una infección subclínica, aunque la infección es comúnmente asociada con problemas respiratorios, intestinales y reproductivos (Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018). Estudios donde se inocularon cachorros con *CBoV-1* demostraron que el virus causaba lesiones como bronquitis, neumonía intersticial, necrosis moderada en las vellosidades intestinales y en algunos casos también miocarditis (Carmichael, Schlafer, & Hashimoto, 1994).

Recientemente se ha demostrado que CBoV-1 podría también estar asociado con la presencia de hepatitis degenerativa (Choi, Jung, Lee, Lee, & Oem, 2016).

La infección de *Bocavirus canino tipo 2* puede presentarse en forma de enteritis, similar a la presentada por CPV-2 y puede acompañarse de atrofia de tejido linfoide (Bodewes et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de CBoV-2 en tejido pulmonar de caninos, presentándose una neumonía intersticial, hiperemia pulmonar y degeneración alveolar (Choi et al., 2015).

El *Bocavirus canino tipo 3* fue identificado en el hígado de un perro que presentaba vómitos y gastroenteritis hemorrágica, en este estudio se reconoció la presencia de *Circovirus canino* co-infectando al animal junto con CBoV-3, en la necropsia se vieron lesiones como vasculitis necrotizante y linfadenitis granulomatosa (Li, Pesavento, et al., 2013).

#### **2.2.7. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR CBoV**

Las infecciones por bocavirus normalmente se diagnostican por pruebas moleculares. La prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) puede detectar fragmentos del genoma viral de biopsias bronco-alveolares, muestras de heces, orina o sangre, amplificando las regiones específicas del virus que codifican para las proteínas NS1, NP1 y VP1/2. La región que codifica para las proteínas NS1 y NP1 son las más usadas para la detección del virus ya que éstas son las zonas mejor conservadas del virus (Guido et al., 2016).

También se ha utilizado pruebas serológicas en la detección de Bocavirus humano, detectando anticuerpos específicos del virus en suero, sin embargo, estos métodos son menos sensibles que el PCR y no están disponibles en pruebas comerciales para CBoV (Guido et al., 2016).

Otro método de diagnóstico es el aislamiento viral, se ha reportado en investigaciones anteriores que *Bocavirus canino* puede ser aislado estrictamente en la línea celular “*Walter Reed Canine*” (WRC), donde se observó que ocasionaba placas citopáticas en las células infectadas (Carmichael et al., 1994). Oshima y colaboradores sugieren también que CBoV puede ser aislado en la línea celular “*Madin-Darby Canine Kidney*” (MDCK) y que forma cuerpos de inclusión intranucleares en las células infectadas (Ohshima et al., 2010).



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. *MATERIALES***

##### **3.1.1. *EQUIPOS***

- Campana de flujo laminar clase II Thermo Scientific 1300 SERIES A2
- Cabina para PCR, UVP UV2 Sterilizing PCR cabinet
- Centrífuga refrigerada y rotor para tubos de 15ml y de 2 ml Labnet HERMLE Z300K
- Báscula digital, Denver Instrument APX-200
- Termociclador, Axygen Maxygene
- Refrigerador 2 - 4°C, Torrey
- Ultra congelador de -20 °C, Torrey
- Bloque térmico, Labnet International
- Cámara de electroforesis Labnet International, Inc. Enduro Electrophoresis System
- Fluorómetro, Quantus™ Fluorometer, Promega
- Micropipetas (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10 µl); (10/0.5 µl).

### **3.1.2. REACTIVOS, ESTUCHES COMERCIALES Y SOLUCIONES UTILIZADAS**

Los estuches comerciales que fueron utilizados en este trabajo son los siguientes:

El estuche comercial E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (OMEGA bio-tek). Los consumibles y reactivos del estuche se enlistan en la tabla 3.

**Tabla 3. Consumibles y reactivos del estuche “E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit**

<b>NOMBRE DEL REACTIVO O CONSUMIBLE</b>	<b>CONTENIDO PARA 50 REACCIONES</b>	<b>PREPARACIÓN PREVIA A SU USO</b>
Mini Columnas de ADN HiBind®	50 piezas	Ninguna
Tubos de recolección de 2 ml	100 piezas	Ninguna
Buffer BL	20 ml	Ninguna
Buffer TL	20 ml	Ninguna
Buffer HBC	25 ml	Agregar 10 ml de isopropanol al 100 %
Buffer de lavado	15 ml	Agregar 60 ml de etanol al 100 %
Buffer de elución	30 ml	Ninguna
Solución de Proteasa OB	1.5 ml	Ninguna
Instructivo	1 manual	---

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó el estuche comercial Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen). Los reactivos del SuperMix se enlistan en la tabla 4.

**Tabla 4. Contenido del estuche Platinum® PCR SuperMix**

NOMBRE DEL REACTIVO	CONTENIDO
Contiene 4 viales de 1.125 ml cada uno de 1.1 X Platinum® PCR SuperMix	
<i>Taq</i> ADN Polimerasa con Ac Platinum® <i>Taq</i>	22 U/ml
Tris-HCL (pH 8.4)	22 mM
KCl	55 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.65 mM
dGTP	220 µM
dATP	220 µM
dTTP	220 µM
dCTP	220 µM
Estabilizadores	Sin especificar

La purificación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó con el estuche comercial OMEGA bio-tek E.Z.N.A. ® Gel Extraction Kit. Los consumibles y reactivos se enlistan en la tabla 5. Kit. Los consumibles y reactivos se enlistan en la tabla 5.

**Tabla 5. Consumibles y reactivos del estuche E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit.**

<b>NOMBRE DEL REACTIVO O CONSUMIBLE</b>	<b>CONTENIDO PARA 50 REACCIONES</b>	<b>PREPARACIÓN PREVIA A SU USO</b>
Mini Columnas de ADN HiBind®	50	Ninguna
Tubos de recolección de 2 ml	100	Ninguna
Buffer de unión XP2	40 ml	Ninguna
Buffer de lavado SPW	25 ml	Agregar 100 ml de 100% de etanol
Buffer de elución	30 ml	Ninguna
Instructivo	1 manual	---

La cuantificación total de ADN de los purificados fue obtenida con la ayuda del estuche comercial QuantiFluor® dsDNA System (Promega). El contenido del estuche se describe en la tabla 6.

**Tabla 6. Contenido del estuche QuantiFluor® dsDNA System**

<b>NOMBRE DEL REACTIVO</b>	<b>CONTENIDO</b>
20X Buffer TE (pH 7.5)	25 ml
QuantiFluor® dsDNA Dye	1 ml
Lambda DNA Standard (100 µg/ml)	100 µg

Las siguientes soluciones fueron preparadas para llevar a cabo la metodología de este trabajo:

- **Solución 1X SB (0.225% de ácido bórico, 0.04% de NaOH).** En 1 litro de agua destilada fueron diluidos 2.25 gramos de ácido bórico (Jalmek) y 0.4 gramos de NaOH (Jalmek). Puede prepararse la solución a 20X y después diluirse al 1X para su uso.
- **Gel de Agarosa al 1.5% (Agarose LE-500, Axygen).** En una báscula digital se pesaron 1.5 gramos de agarosa de grado molecular, se aforan a 100 ml con buffer 1X SB, para solubilizar la agarosa se debe calentar la solución con un agitador magnético, también puede utilizarse un microondas para calentar la solución.
- **Solución 6X azul de bromofenol.** En 3 ml de glicerol (Glycerol, No. Cat. G5516-100ML, Sigma-Aldrich) agregar 25 mg de azul de bromofenol (Bromophenol Blue, No. Cat. 115-39-9, Sigma-Aldrich) y aforar a 10 ml con de agua para PCR (Water, PCR Reagent, No.Cat. W1754, Sigma-Aldrich)
- **3X GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Biotium).** Se diluyó a 1:3, 300 en 0.1 M NaCl previamente.

### **3.2. METODOLOGÍA**

#### **3.2.1. LUGAR DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de esta investigación se analizaron en los laboratorios de Virología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **3.2.2. ÁREA DE MUESTREO**

El muestreo se realizó en la población canina que presentaron problemas digestivos y fueron a consulta en las distintas clínicas de Monterrey y su área metropolitana durante el periodo de junio 2016 a noviembre 2019 (Fig. 5).



**Figura 5. Área de muestreo.** Se muestran en color los municipios que participaron en la colección de muestras para este trabajo (*Salinas Victoria, Escobedo, Apodaca, San Nicolás de los Garza, Monterrey, San Pedro Garza García y Santiago*).

Las muestras fueron proporcionadas por clínicas veterinarias que desearon participar en el estudio ubicadas en el área metropolitana de Monterrey y fueron transportadas inmediatamente a la FMVZ para su procesamiento.

A los clínicos se les proporcionó una encuesta donde se describen los datos de la mascota, así como su historial clínico y su calendario de vacunación (Anexo 1).

### **3.2.3. TIPO Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LA MUESTRA**

El tipo de muestra que se recolectó fueron heces e hisopados rectales a partir de pacientes que presentaron el cuadro de gastroenteritis aguda y de animales aparentemente sanos, así como también muestras de tejidos de animales fallecidos. Las muestras se almacenaron en tubos cónicos de 15 ml y fueron refrigeradas por los clínicos, éstas se transportaron dentro de las siguientes 12 a 24 horas al laboratorio para extraer los ácidos nucleicos. Las muestras de tejidos se conservaron en formalina bufferada al 10%, además se tomó una muestra para prueba de biología molecular. Las muestras de tejido para prueba de biología molecular fueron recogidas en menos de 2 horas y si fueron congeladas se recolectaron en no más de 24 horas, cuidando que no se descongelaran durante el transporte, transportándolas en CO<sub>2</sub>.

En el laboratorio, los hisopos fueron agitados vigorosamente con la ayuda de un vortex por 5 minutos para que todas las células del hisopo quedaran inmersas en la

solución salina fisiológica, después se procedió a hacer la extracción de ácidos nucleicos o bien fue conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **3.2.4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE LA MUESTRA**

La purificación del ADN total de la muestra, incluyendo el genoma viral de CCV y CBoV se llevó acabo utilizando el estuche comercial E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (OMEGA bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN viral obtenido fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El procedimiento se describe a continuación: Se colocaron 250  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida del hisopo o del sobrenadante de la muestra de heces 200  $\mu\text{l}$  de buffer TL y 25  $\mu\text{l}$  de solución proteasa OB en un microtubo de 1.5 ml, se homogenizó con ayuda de un agitador vortex y se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  en un bloque térmico por 3 horas. Después del periodo de incubación se centrifugó el microtubo a 10,000 rpm por 5 minutos para llevar el desecho celular al fondo del microtubo. El sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo estéril de 1.5 ml, al cual se le añadieron 220  $\mu\text{l}$  de buffer BL y se agitó con un vortex para después incubar la muestra a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Pasando el tiempo de incubación, se le añadieron 220  $\mu\text{l}$  de 100% de etanol y se agitó vigorosamente con un vortex. Después, toda la muestra fue transferida a una mini columna de ADN HiBind® dentro de un tubo de recolección de 2 ml proporcionado en el estuche y se centrifugó a velocidad máxima ( $\geq 13,000$  rpm) por un minuto. Fue descartado el filtrado y usando el mismo tubo de



recolección, se le añadieron 500 µl de buffer HBC para después centrifugar a velocidad máxima por 30 segundos. Se desecharon el filtrado y el tubo de recolección. La mini columna de ADN HiBind® fue transferida a un tubo de recolección de 2 ml nuevo, se le añadieron 700 µl de buffer de lavado y se centrifugó a velocidad máxima por 30 segundos. Se descartó el filtrado y se procedió a hacer un segundo lavado en el mismo tubo, desechando el filtrado generado. Se centrifugó la mini columna de ADN HiBind® vacía por dos minutos a velocidad máxima para secar la columna (remover todo residuo de etanol). La mini columna de ADN HiBind® fue transferida a un microtubo estéril de 1.5 ml, se le añadieron de 100 a 200 µl de buffer de elución previamente calentado a 70 °C y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 minutos. Pasado el tiempo de reposo, se centrifugó a velocidad máxima por un minuto y se procedió a realizar una segunda elución. El filtrado final contiene el ADN extraído, si no se usa inmediatamente se conserva a -20 °C.

### **3.2.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

#### **3.2.5.1. Controles positivo y negativo para CCV**

Para obtener el control positivo tanto de CCV como de CBoV se realizó una búsqueda de secuencias completas de las cepas virales publicadas en el GenBank, con las que se realizó un alineamiento múltiple de secuencias usando software DNASTAR v.15, el programa MegaAlignPro y el algoritmo ClustalW. Para en base

a este alineamiento buscar las regiones conservadas entre las cepas para el diseño de la sonda sintética que serviría como control positivo para los virus de estudio. Para el caso de *Circovirus canino* la sección comprendida entre las bases 1509-1918 de la secuencia del genoma de la cepa 214 de CCV reportada con número de acceso JQ821392 del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) que se mandó sintetizar artificialmente (sonda o gBlock), la cual se puede observar en resultados en la en la figura 6.

Como control negativo se utilizó agua para PCR libre de nucleasas de la marca comercial Sigma-Aldrich.

#### **3.2.5.2.     *Diseño de oligonucleótidos para el PCR de CCV***

Para la detección de *Circovirus canino* fueron diseñados oligonucleótidos utilizando un segmento del genoma que codifica para la proteína de la Cápside (Cap), basándose en un alineamiento múltiple de las secuencias publicadas en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) mediante el uso del programa Primer Select/DNSTAR v.15 y el programa NCBI/Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa eurofins/Genomics. Los oligonucleótidos diseñados y sus especificaciones se muestran en resultados en la tabla 9.

### **3.2.5.3. Control positivo y negativo para CBoV**

De igual forma que para CCV, se realizó una búsqueda de secuencias de CBoV tipo 1 y 2 y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, a partir de las cuales se detectaron las secuencias conservadas del genoma de estos virus que fueron utilizadas para la síntesis del control positivo. Seleccionado para el *Bocavirus canino tipo 1* una secuencia de nucleótidos que contiene parte del gen de la proteína no estructural NP1 (de la base 2418 a la base 2688) de la secuencia genética de la cepa *Canine minute virus*, con número de acceso NC\_004442 reportada en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Esta secuencia se muestra en la figura 6 de color rojo.

El control positivo utilizado para la detección de *Bocavirus canino tipo 2* fue una secuencia de nucleótidos que contiene parte del gen de la proteína no estructural NP1 de *Bocavirus canino tipo 2* (Fig. 6), comprende de la base 2296 a la base 2530 de la secuencia de CBoV-2, cepa GZHD15 con número de acceso KY038922 reportada en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Como control negativo se utilizó agua para PCR de la marca Sigma-Aldrich.

### **3.2.5.4. Diseño de oligonucleótidos para el PCR de CBoV**

Para el diseño de oligonucleótidos del PCR para CBoV-1 se utilizó la secuencia del gen de la proteína no estructural NP1, basándose en un alineamiento múltiple de

secuencias publicadas en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) utilizando los programas Primer Select/DNASTAR v.15 y NCBI/Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Los oligonucleótidos y sus especificaciones se muestran en resultados en la tabla 10.

Los oligonucleótidos utilizados para detectar *Bocavirus canino tipo 2* fueron diseñados utilizando el gen de la proteína no estructural NP1, usando un alineamiento múltiple de secuencias publicadas en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) con los programas Primer Select/DNASTAR v.15 y NCBI/Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Las especificaciones de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 10 en el apartado de resultados.

#### **3.2.5.5. Condiciones de la PCR para CCV y CBoV**

Para CCV, se utilizaron para el PCR los oligonucleótidos diseñados CCV/CAP/1517 y CCV/CAP/1908 y para el PCR semianidado los oligonucleótidos CCV/CAP/1517 y CCV/CAP/1743.

Para el PCR de CBoV-1 se utilizaron los oligonucleótidos diseñados CBoV/NP1/2305 y CBoV1/NP1/2678 y para el PCR semianidado de CBoV-1 los oligonucleótidos CBoV/NP1/2305 y CBoV1/NP1/2535.

Por último, para CBoV-2 se utilizaron los oligonucleótidos para el PCR CBoV/NP1/2305 y CBoV2/NP1/2520-2 y para el PCR semianidado los oligonucleótidos CBoV/NP1/2305 y CBoV2/NP1/2417-1.

Para la optimización de los PCR, los oligonucleótidos fueron seleccionados con una temperatura de alineamiento promedio de 60 °C y realizando un gradiente de temperatura de 1 grado centígrado de 55 °C a 61 °C se estableció la temperatura óptima del alineamiento de los oligonucleótidos.

Para realizar el PCR se utilizó el estuche comercial Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen), cuyo contenido se muestra en materiales.

Para el PCR de lo virus detectados en este trabajo, se utilizó un volumen de reacción de 25 µl (22 µl de 1.1X PCR SuperMix, 0.5 µl de 50 µM de cada oligonucleótido, así como 2 µl de ADN de la muestra).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- 1 ciclo (desnaturalización inicial: 92 °C - 5 min.),
- 40 ciclos (desnaturalización a 92 °C - 30 seg.; alineamiento 58 °C - 30 seg.; extensión 72 °C - 1 min.) y
- 1 ciclo final de extensión (72 °C - 5 min; 4 °C - 1 min.).

El volumen y condiciones de amplificación fueron iguales para el PCR y el PCR semianidado de CCV y CBoV.

### **3.2.6. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS Y DOCUMENTACIÓN DE RESULTADOS**

Los productos del PCR y PCR semianidado se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % diluido en buffer 1X SB. Para ello, la agarosa se vertió en un molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Los productos de amplificación, los controles y el marcador de peso molecular fueron cargados en el gel de agarosa, previamente mezclados con 3 µl de azul de bromofenol y 3 µl de 3X GelRed (ver punto 3.1.2 para la solución).

La electroforesis fue realizada en una cámara marca Labnet Internacional a 120 voltios con 90 amperes por 60 minutos usando un buffer 1X SB (ver punto 3.1.2 para la solución).

Para la observación de los productos amplificados se utilizó un transiluminador (longitud de onda de 302-311 nm) y fue capturada una imagen del gel con un fotodocumentador para su posterior análisis.

### **3.2.7. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GEL DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN**

Previo a la secuenciación fue necesaria la purificación de las muestras positivas, utilizando el estuche comercial OMEGA bio-tek E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit cuyo contenido se describe en materiales.

Para ello se realizó una electroforesis de las muestras, después se recortó un segmento del gel que corresponde a los fragmentos deseados; 393 pb para *Circovirus canino*, 253 pb para *Bocavirus canino tipo 1* y 215 pb para *Bocavirus canino tipo 2*.

Los fragmentos de gel se pasaron a un microtubo estéril de 2 ml previamente pesado, para poder determinar el peso total del fragmento de gel de agarosa. Considerando una densidad de 1g/ml del gel, se agregaron 100 µl de buffer de unión XP2 por cada 0.100 g de gel y se incubó a 60 °C por 7 minutos o hasta que el gel se haya disuelto. Después de la incubación, 700 µl de la solución de ADN/agarosa se transfirieron a una mini columna de ADN HiBind® previamente colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, se desecho el filtrado y reusando el tubo de recolección, se añadieron 300 µl del buffer de unión XP2. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto y se desechó el filtrado. Fueron añadidos 700 µl de buffer de lavado, se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto y fue desechado el filtrado. Se repitió el proceso anterior para un segundo lavado de ADN. Después del segundo lavado, se centrifugó la mini columna de ADN HiBind® vacía a 13,000 rpm por 2 minutos para eliminar el residuo de etanol. La mini columna de ADN HiBind® fue transferida a un microtubo estéril de 1.5 ml y se le añadieron 50 µl de buffer de elución, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El filtrado final contiene el ADN purificado, se almacenó a -20 °C para su posterior secuenciación.

Para verificar la concentración total de ADN en el purificado, fue utilizado el estuche comercial QuantiFluor® dsDNA System. En un microtubo de 500 µl se agregaron 99 µl de la solución de trabajo DYE del estuche y 1 µl de la muestra a cuantificar. Se agitó vigorosamente en un vórtex y el tubo pasó a ser analizado con el equipo Quantus™ Fluorometer (Promega) para verificar la concentración total de ADN del purificado.

Tomando en cuenta que la concentración ideal para secuenciar un fragmento de 300-700 pb es de 20-30 ng/µl, las muestras que alcanzaron dicha concentración fueron enviadas a la empresa Macrogen en Estados Unidos para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con el programa NCBI/BLASTN 2.8.0 (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) para establecer la identidad de las secuencias en la base de datos del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI).

### **3.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos epidemiológicos de las muestras fueron obtenidos por medio de una encuesta (Anexo 1) donde se recopilaron datos como la edad, sexo, raza, protocolo de vacunación, signos clínicos, entre otros.

Para conocer si existe asociación entre las variables cualitativas (edad, sexo, signología (diarrea, diarrea hemorrágica, vómito) así como la muerte) además de co-infecciones con Parvovirus canino con la presencia de CCV y CBoV se utilizó la



prueba no paramétrica de Chi-cuadrado del software WinEpi, con un nivel de confianza del 95 %.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. LUGAR DE COLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras fueron tomadas por los clínicos que participaron en este proyecto, al momento de la consulta y distribuidas en distintos municipios del área metropolitana de Monterrey, N.L.

El procesamiento de las muestras fue realizado en los laboratorios de Virología y de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

### **4.2. ÁREA DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS**

Las clínicas que participaron en este proyecto pertenecen a los siguientes municipios: Apodaca, General Escobedo, Monterrey, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro y Santiago, municipios que integran el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

El total de muestras analizadas fue de 150. De estas, 3 provenían del municipio de Apodaca, de General Escobedo fueron 34 muestras, del municipio de Monterrey fueron 14 muestras, 73 muestras analizadas fueron del municipio Salinas Victoria, del municipio de San Nicolás de los Garza se analizaron 13 muestras, del municipio de San Pedro fueron 10 muestras y, por último, 3 muestras fueron del municipio de Santiago. El porcentaje de muestras por municipio se puede ver en la tabla 7.

**Tabla 7. Número de muestras de este estudio y municipios de procedencia**

<b>Municipio</b>	<b>Número de muestras por municipio</b>	<b>Porcentaje de muestras por municipio</b>
Salinas Victoria	73	48.6 %
General Escobedo	34	22.6 %
Monterrey	14	9.3 %
San Nicolás de los Garza	13	8.6 %
San Pedro	10	6.6 %
Apodaca	3	2 %
Santiago	3	2 %
<b>TOTAL</b>	<b>150</b>	<b>100 %</b>

#### **4.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS**

Un total de 150 muestras fueron analizadas, de las cuales 125 provenían de pacientes con signología de gastroenteritis y 25 muestras de pacientes sin sintomatología (sanos). De las muestras obtenidas, 113 (69.3 %) fueron diagnosticadas con Parvovirus canino tipo 2 por PCR y PCR anidado (Cedillo-Rosales, 2019).

De las muestras analizadas el 64.6 % (97/150) presentó emesis, el 36.6 % (55/150) llegaron a presentar algún tipo de diarrea mucoide (pastosa, verdosa, o amarillenta), de igual manera el 36.6 % (55/150) presentaron diarrea hemorrágica y el 16.6 % (25/150) no llegaron a presentar ningún tipo de signología de gastroenteritis. El 15.3

% (23/150) de las muestras provenían de pacientes que fallecieron por una gastroenteritis severa.

**Tabla 8. Signología clínica presente en caninos muestreados en el área metropolitana de Monterrey, N.L**

	Sin signología	Emesis	Diarrea mucoide	Diarrea hemorrágica	Muerte
Número de muestras	16.6 % (25/150)	64.6 % (97/150)	36.6 % (55/150)	36.6 % (55/150)	15.3 % (23/150)

#### ***4.4. DISEÑO DE SONDA SINTÉTICA COMO CONTROL POSITIVO PARA PCR DE CCV Y CBoV.***

Como control positivo para el PCR de CCV y CBoV1-2 fue diseñada una sonda sintética de 918 nucleótidos. Dicha secuencia comprende secuencias parciales de tres genes de los virus de estudio. En la región 5' de la sonda se ubica la secuencia seleccionada como control positivo para CBoV tipo 2 que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a parte del gen de la proteína no estructural NP1 de la base 2296 a la base 2530 de la secuencia de CBoV-2, cepa GZHD15 con número de acceso KY038922 reportada en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI), que se puede observar de color amarillo en la figura 6. Así mismo, le sigue la secuencia sintética control para el CBoV-1 que se muestra en la imagen de la figura 6 de color rojo y comprende parte del gen de la proteína no estructural NP1 (de la base 2418 a la base 2688) de la

secuencia genética de la cepa *Canine minute virus*, con número de acceso NC\_004442 reportada en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Por último, en la región 3' de la sonda se encuentra la secuencia sintética control para *Circovirus canino* que contiene parte del gen de la proteína de la cápside ente la base 1509 a la base 1918 de la secuencia del genoma de la cepa 214 de CCV reportada con número de acceso JQ821392 del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI), esta secuencia se muestra en la figura 6 de color azul.

```

AGTCACCATCGGAGCCGGAGTCGGAGTCCACGGGACTCACGCCTTCAGAGTGGGGAGAGATGCT
CGGAGTCGTCTGCAAGTCGCTGGAGGAAGAGCCGATCGTCTTACACTGCTTCGAAGACATCGCC
TCTCTCTCGGAGACCGAAGACGACTCCGATGGAGGTCTTCAATCAACACCGCGCCAAAACAAAG
ACTGACATTTCAATGTGTGGCTTTTACTGGCACAGTACTCGCCAAAAGCGAGGAGCCGGAGTCG
CAGTCCACAGGACTCACGCCGTCCGAATGGGGAGAGAGACTTGGGATCATTCCACAGGGGATGG
ACCAGGAACCAATCGTCTCTCACTGTTTCGAGACAATCGACTGGGAGGAAGACAACACCGATGC
ATGTATTCAATGAACATAAAAGCAGAAGCAAAGAACCCTCTTCTGCGTTCTGTGGCTTCTACTG
GCACAGCACTAGATTAGCTCGGTGTGGGACTGACTGGATTTTTAATGAGGGAAAACCCCTCTAAA
TGTGATCTTGTAGCATTCCCTCTTCCTTGATCTTCACCGTCAAGATCAAGTGCTGTTCTTCCAA
GAACGTTTTCCATGAGTGTTTTGGGCCAGTTAATCCATCTTGCCCTTATGTATACTTTTTTGAA
TTTGTAGAATCTAAATGGTGGGAGATGCTGGAAATCTCCTGTTCCATGCGATGCTTGTAGGAAG
TCTGTTAATTTAAATGACAGATGGTCAAAGTTCCATAGCAACGGTGCTCTGTCTGAGGATCAT
TGGTTGGTTTAACTGGTGCTGTCGGCCAATCAGCTGTGAGTGTTCTGCGCAGTCGCAGATGAAA
CAGTTTGAATCTGTTTTGGCGCCTTCTCCTGTAACGGTTCAATGGGCGTGTCCTGTAGTTCCGG
CGACTTGCCCGGGCATGTCTTC

```

**Figura 6. Sonda sintética (control positivo) de CCV, CBoV1-2.** Secuencia sintética diseñada y sintetizada, comprende 918 nucleótidos. Se muestra en color amarillo secuencia control de CBoV-2 (No. Acceso KY038922); en color rojo la secuencia de CBoV-1 (No. Acceso NC\_004442) y en color azul la secuencia de CCV (No. Acceso JQ821392).

#### **4.5. PCR Y PCR SEMIANIDADO PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE CIRCOVIRUS CANINO**

El diseño de oligonucleótidos para *Circovirus canino* fue realizado utilizando la región que codifica para la proteína de la cápside. La posición de los oligonucleótidos en el genoma completo se basó en la secuencia de la cepa de Circovirus canino aislado 214 con número de acceso al GenBank JQ821392. Los oligonucleótidos y sus características se muestran en la tabla 9.

La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos se estableció después de realizar un gradiente de temperatura a 58 °C, donde se amplificó en forma más clara el segmento de ADN esperado.

Una vez establecida la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, se determinaron el resto de los parámetros de los protocolos de PCR y PCR semianidado para CCV, donde el volumen y las condiciones de amplificación fueron iguales para ambos PCR.

Las condiciones de amplificación establecidas para el PCR y el PCR semianidado y fueron las siguientes:

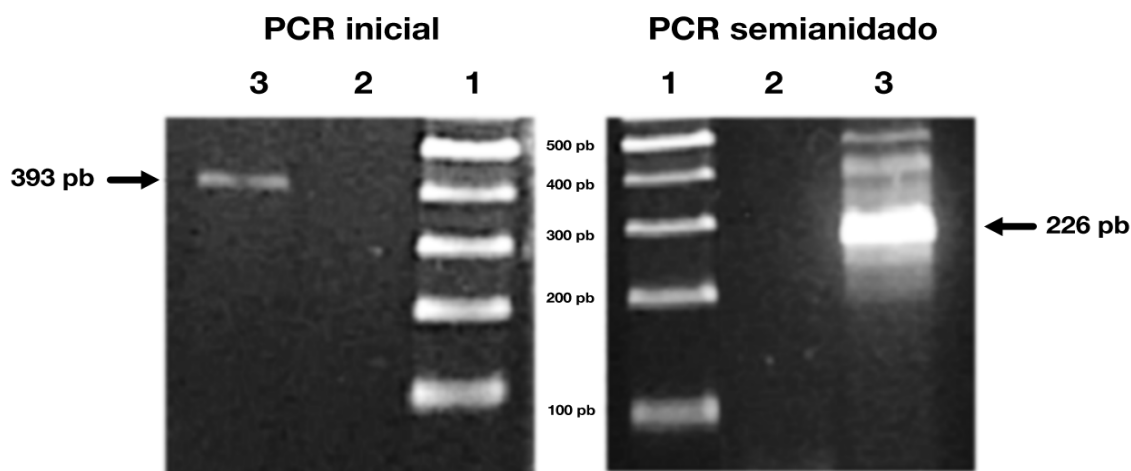
- 1 ciclo inicial
  - Desnaturalización inicial: 92 °C - 5 min.
- 40 ciclos
  - Desnaturalización a 92 °C - 30 seg.;
  - Alineamiento 58 °C - 30 seg.;
  - Extensión 72 °C - 1 min.
- 1 ciclo final
  - Extensión final a 72 °C - 5 min.;
  - Condensación a 4 °C - 1 min.

**Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR semianidado que amplifican un segmento del gen de la proteína de la Cápside de Circovirus canino**

PCR	Nombre	Secuencia	Sentido	Localización (No. acceso GenBank)	Tm	Tamaño del fragmento amplificado
PCR	CCV/CAP/1517	ATCTTGTCATTTCCTCTTCC	Forward	1517 (JQ821392)	58.5	393 pb
	CCV/CAP/1908	CCGGGCAAGTCGSCG	Reverse	1908 (JQ821392)	60.5	
PCR semianidado	CCV/CAP/1517	ATCTTGTCATTTCCTCTTCC	Forward	1517 (JQ821392)	58.5	227 pb
	CCV/CAP/1743	GCTATGGAACTTYGAYCAYCTGTC	Reverse	1743 (JQ821392)	59.6	

En el PCR inicial que se realizó para CCV logró amplificar a partir de la sonda control (gBlock) una banda de ADN con tamaño aproximado de 393 pb que se puede observar en la figura 7.

Por otro lado, se realizó un PCR anidado a partir de la primera reacción de PCR para aumentar la sensibilidad de la prueba, donde se logró amplificar una banda de 227 pb que se puede observar señalada con una flecha en la imagen de la derecha en la figura 7.



**Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR y PCR semianidado para *Circovirus canino*.** Se realizó un PCR para CCV para amplificar un fragmento de 393 pb del gen que codifica la proteína de la cápside (CAP). El PCR semianidado para CCV amplificó un segmento de 226 pb de gen de la CAP. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2.** Control Negativo, agua para PCR. **Carril 3.** Control Positivo, secuencia sintética que contienen el segmento de ADN control (gBlock).



#### **4.6. ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y PCR SEMIANIDADO PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE BOCAVIRUS CANINO TIPO 1 y 2**

El diseño de oligonucleótidos para CBoV-1 y CBoV-2 fue realizado utilizando la región que codifica para la proteína NP1.

Para determinar la posición de los oligonucleótidos en el genoma de CBoV-1 se utilizó la secuencia de CBoV-1, cepa *Canine minute virus* con número de acceso del GenBank NC\_004442. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 10.

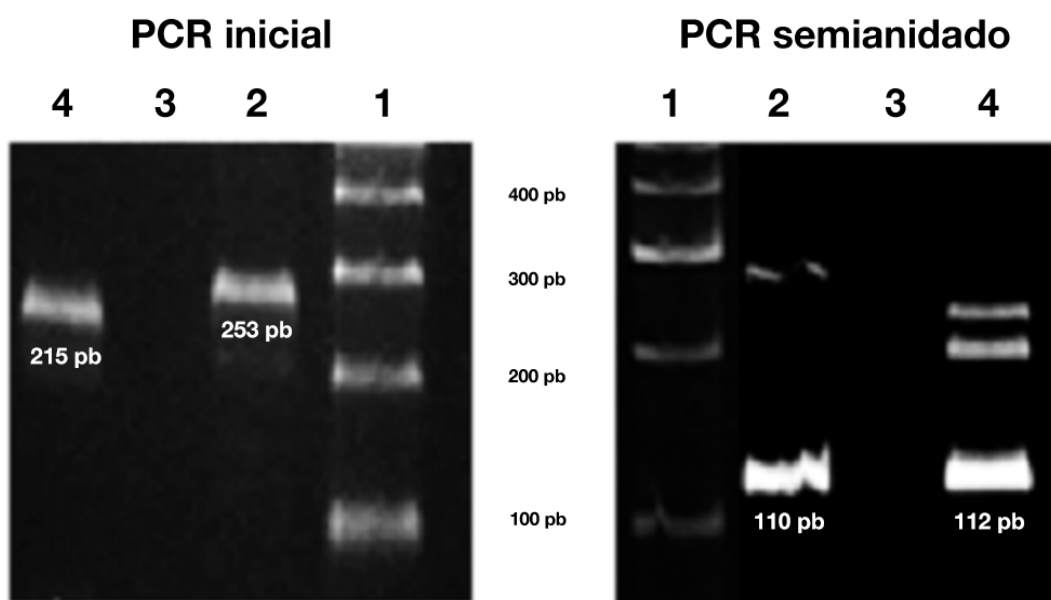
Para determinar la posición de los oligonucleótidos en el genoma de CBoV-2, se utilizó la secuencia de la cepa GZHD15 con número de acceso del GenBank KY038922. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 10.

Las condiciones de amplificación se establecieron mediante un gradiente de temperatura, estableciendo la temperatura ideal de alineamiento de oligonucleótidos a 58 °C, estas condiciones fueron iguales para el PCR y PCR anidad de ambos virus: estas condiciones fueron iguales para el PCR y PCR anidad de ambos virus:

- 1 ciclo inicial
  - Desnaturalización inicial: 92 °C-5 min.
- 40 ciclos
  - Desnaturalización a 92 °C-30 seg.;
  - Alineamiento 58 °C-30 seg.;
  - Extensión 72 °C-1 min.
- 1 ciclo final
  - Extensión final a 72 °C-5 min.;
  - Condensación a 4 °C-1 min.

Una vez establecido el PCR inicial de *CBoV-1* fue posible amplificar un segmento de ADN con tamaño aproximado de 253 pb, esta banda se puede observar en la figura 8.

Por otro lado, en el PCR semianidado para *CBoV-1* se realizó a partir del resultado del PCR inicial amplificando una banda de ADN de aproximadamente 110 pb, así mismo, se obtuvo una banda de 215 pb en el PCR inicial de *CBoV-2* y de 112 pb para el PCR semianidado (Fig. 8).



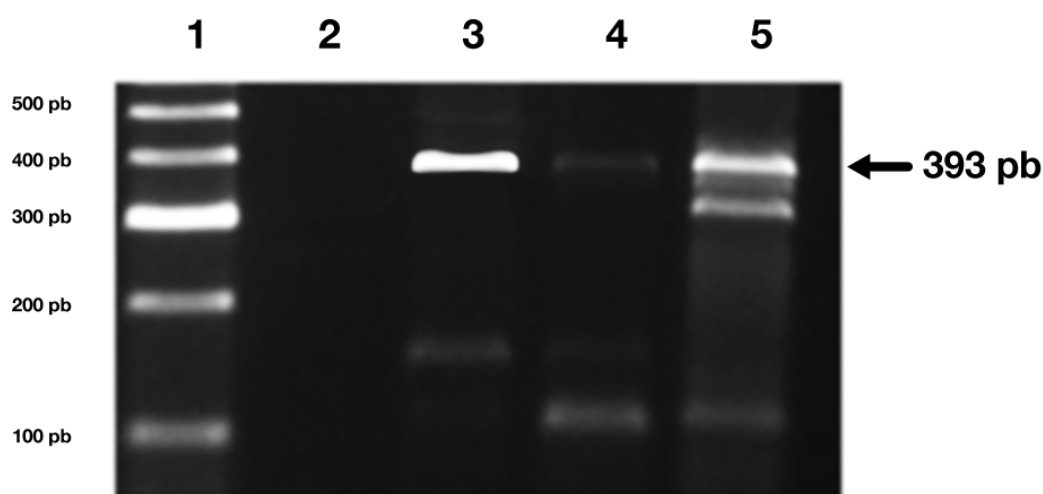
**Figura 8. Electroforesis de productos de PCR y PCR anidados de Bocavirus canino.** Se estableció un PCR inicial para *CBoV-1* que amplificó un segmento de 253 pb del gen la proteína NP1 y de 215 pb para *CBoV-2*. El PCR semianidado amplificó un segmento de 110 pb para *CBoV-1* y de 112 pb para *CBoV-2*. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100 pb., **Carril 2.** Control Positivo, gBlock para *CBoV-1*, **Carril 3.** Control Negativo (Agua para PCR) **Carril 4.** Control Positivo, gBlock para *CBoV-2*.

**Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR semianidado que amplifican un segmento del gen de la proteína NP1 de Bocavirus canino**

PCR	NOMBRE	SECUENCIA	SENTIDO	LOCALIZACIÓN (NO. ACCESO GENBANK)	TM	TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO
PCR	CBoV/NP1/2305	GGAGCCGGAGTCGSAG	Forward	2305 (NC_004442)	58.32	253 pb
	CBoV1/NP1/2678	TCATTAAAAATCCAGTCAGTCCCA	Reverse	2678 (NC_004442)	58.11	
PCR semianidado	CBoV/NP1/2305	GGAGCCGGAGTCGSAG	Forward	2305 (NC_004442)	59.40	110 pb
	CBoV1/NP1/2535	TCTCGAAACAGTGGAGGACG	Reverse	2535 (NC_004442)	59.67	
PCR	CBoV/NP1/2305	GGAGCCGGAGTCGSAG	Forward	2305 (KY038922)	58.32	215 pb
	CBoV2/NP1/2520	GTGCCAGTAAAAGCCACACA	Reverse	2520 (KY038922)	58.97	
PCR semianidado	CBoV/NP1/2305	GGAGCCGGAGTCGSAG	Forward	2305 (KY038922)	59.40	112 pb
	CBoV2/NP1/2417	GTCTTCGAAGCAGTGTAAGACG	Reverse	2417 (KY038922)	59.34	

#### 4.7. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA CIRCOVIRUS CANINO

A través del PCR y PCR anidado estandarizado en este trabajo para CCV, se procesaron 150 muestra provenientes a partir de caninos del área metropolitana de Monterrey N.L. En la figura 9 se muestra el resultado del PCR para algunas muestras procesadas para CCV.



**Figura 9. Electroforesis de PCR de un segmento del gen de la proteína CAP del Circovirus canino.** Se realizó un PCR para CCV para amplificar un fragmento de 393 pb del gen que codifica la proteína CAP. **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Control negativo (agua para PCR). **Carril 3.** Muestra 18. **Carril 4.** Muestra 19. **Carril 5.** Control positivo (secuencia sintética de segmento de CCV (gBlock)).

De estas muestras, 125/150 provenían de caninos con signología de gastroenteritis, por lo que la muestra que se tomó fueron heces tomadas a partir de la evacuación o de hisopos rectales. Mientras que 25/150 provenían de animales aparentemente sanos y se toma la muestra también a través de un hisopo rectal.

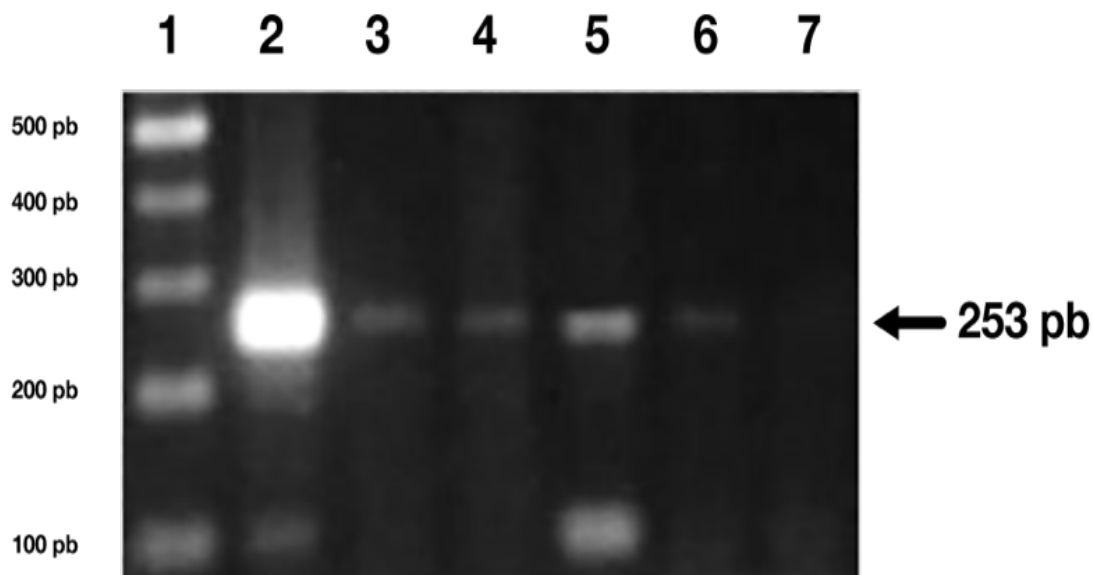
En este estudio se pudo detectar mediante la prueba de PCR en el 6.6 % (10 muestras de las 150) la presencia de genoma de *Circovirus canino*. Las muestras que fueron positivas y las características de signología, edad, sexo y protocolos de vacunación con que contaban los caninos en ese momento se describen en la tabla 11.

**Tabla 11. Características generales de los caninos positivos a CCV a través de PCR**

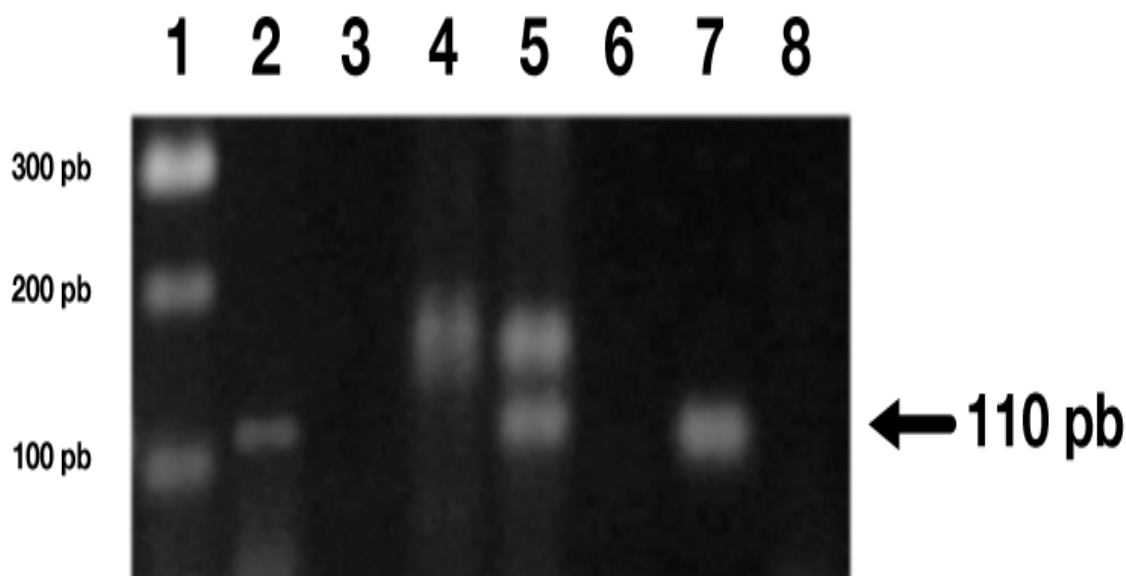
No. de muestra	Signología	Edad	Raza	Protocolo de vacunación administrado
5	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	2m	Criollo	Sin vacunas
8	Vómito y diarrea hemorrágica	> 1a	Dashound	Sin vacunas
18	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	Cuadro de vacunación completo
19	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	Sin vacunas
20	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	Sin vacunas
24	Vómito y diarrea mucoide	3m	Criollo	Sin vacunas
30	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	Sin vacunas
34	Vómito y diarrea hemorrágica	3m	Schnauzer	Sin vacunas
111	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	2m	Pitbull	Sin vacunas
116	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Criollo	Sin vacunas

#### **4.8. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA BOCAVIRUS CANINO**

De igual forma estas 150 muestras fueron procesadas a través del PCR específico para CBoV-1 donde se obtuvo una amplificación de un segmento del gen que codifica para la proteína de la cápside de 253 pb (Fig. 10) y 110 pb en el PCR semianidado (Fig. 11).



**Figura 10. Electroforesis del PCR de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-1.** Se realizó un PCR específico para CBoV-1 con un producto de amplificación de 253 pb. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2.** Control positivo (secuencia sintética de ADN de CBoV-1, gBlock). **Carril 3.** Muestra 106. **Carril 4.** Muestra 107. **Carril 5.** Muestra 108. **Carril 6.** Muestra 109. **Carril 7.** Control negativo. (agua para PCR).



**Figura 11. Electroforesis del PCR semianidado de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-1.** Se realizó un PCR semianidado para CBoV-1 con un producto de amplificación de 110 pb. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 50 pb. **Carril 2.** Control positivo (secuencia sintética de ADN de CBoV-1, gBlock). **Carril 3.** Muestra 26. **Carril 4.** Muestra 27. **Carril 5.** Muestra 28. **Carril 6.** Muestra 29. **Carril 7.** Muestra 30. **Carril 8.** Control negativo (agua para PCR).

En este estudio se pudo detectar en el 14.6 % (22/150) de las muestras el genoma del *Bocavirus canino tipo 1*.

Las muestras que fueron positivas y las características de signología, edad, sexo y protocolos de vacunación que tenían los caninos al momento del muestreo se describen en la tabla 12.

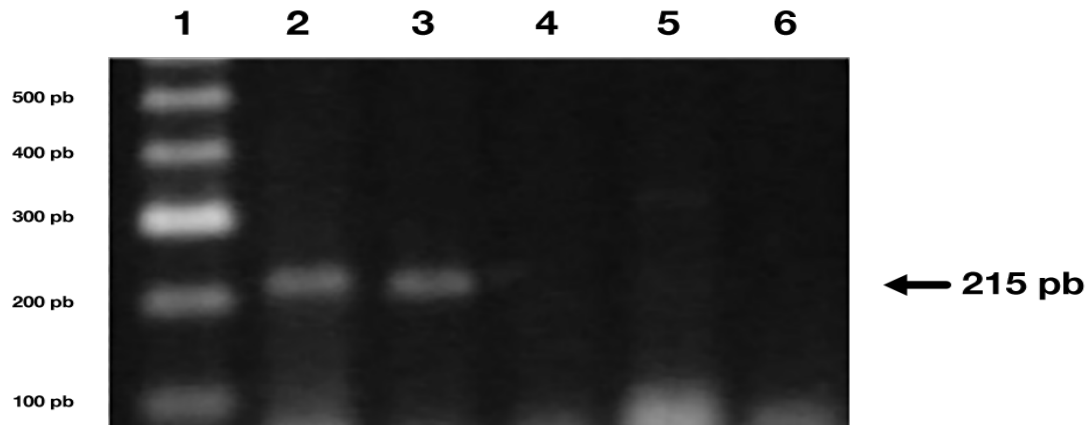
**Tabla 12. Características generales de los caninos positivos a CBoV-1 a través de PCR**

<b>No. de muestra</b>	<b>Signología</b>	<b>Edad</b>	<b>Raza</b>	<b>Protocolo de vacunación administrado</b>
22	Vómito y diarrea mucoide	3m	Pitbull	Sin vacunas
25	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Chihuahua	Sin vacunas
28	Diarrea mucoide y muerte	3m	Pitbull	Sin vacunas
30	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	Sin vacunas
35	Diarrea hemorrágica y muerte	5m	Husky	Sin vacunas
36	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Poodle	Sin vacunas
37	Vómito y diarrea mucoide	4m	Criollo	Sin vacunas
60	Vómito y diarrea mucoide	3m	Beagle	Sin vacunas
61	Vómito y diarrea hemorrágica	2m	Husky	Sin vacunas
61	Vómito y diarrea hemorrágica	2m	Pastor Alemán	Sin vacunas
69	Vómito y diarrea hemorrágica	4m	Pug	Sin vacunas
81	Vómito	2m	Akita	Sin vacunas
106	Vómito y diarrea mucoide	5m	Chihuahua	Cuadro de vacunación completo
107	Diarrea hemorrágica	3m	Golden Retriever	Cuadro de vacunación completo
108	Vómito y diarrea mucoide	2m	Cocker Spaniel	Sin vacunas
109	Vómito y diarrea mucoide	4m	Husky	Sin vacunas
113	Sin signología	9m	Chihuahua	Sin vacunas
115	Diarrea hemorrágica y muerte	4m	Husky	Sin vacunas

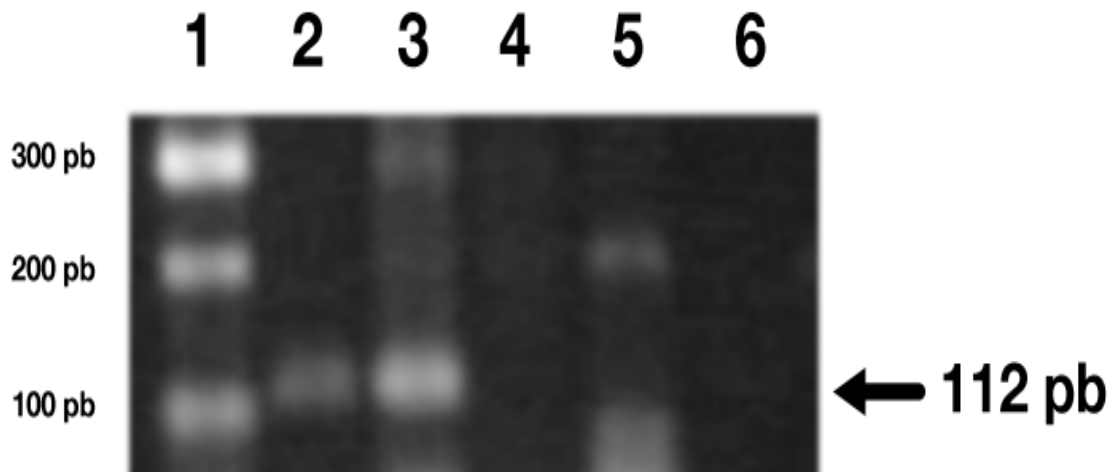


116	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Criollo	Sin vacunas
117	Vómito y diarrea mucoide	5m	Beagle	Sin vacunas
130	Sin signología	> 1a	Criollo	Cuadro de vacunación completo
141	Sin signología	> 1a	Criollo	Cuadro de vacunación completo

Por otro lado, en el caso de los resultados que se obtuvieron a través del PCR específico para CBoV-2 se pudieron observar bandas de ADN específicas para los tamaños descritos para el PCR de 253 pb (Fig. 12) y PCR semianidado de 112 pb (Fig. 13).



**Figura 12. Electroforesis de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-2 amplificado por PCR.** Resultados de la electroforesis de un segmento de 215pb del gen de la proteína NP1 de cepas de CBoV-2. **Carril 1.** Marcador de peso de 50 pb. **Carril 2.** Control positivo (secuencia sintética de gen de la proteína NP1, (gBlock). **Carril 3.** Muestra 81. **Carril 4.** Muestra 82. **Carril 5.** Muestra 83. **Carril 6.** Control negativo (agua para PCR).



**Figura 13. Electroforesis del PCR semianidado de un fragmento de ADN del gen de la proteína NP1 de CBoV-2.** Resultados de la electroforesis de un segmento de 112 pb del gen de la proteína NP1 de CBoV-2. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 50 pb. **Carril 2.** Control positivo (secuencia sintética del gen de la proteína NP1, gBlock). **Carril 3.** Muestra 21. **Carril 4.** Muestra 22. **Carril 5.** Muestra 23. **Carril 6.** Control negativo (agua para PCR).

De las 150 muestras de caninos provenientes de diversos municipios del área metropolitana de Monterrey, N.L. se pudo amplificar un fragmento del genoma del *Bocavirus canino tipo 2* en un 10% (15/150) de estas. de estas.

Los datos recabados en cuanto a sexo, edad, signología y protocolos de vacunación se anexan para cada canino en la tabla 13.

**Tabla 13. Características generales de los caninos positivos a CBoV-2 a través de PCR**

<b>No. de muestra</b>	<b>Signología</b>	<b>Edad</b>	<b>Raza</b>	<b>Protocolo de vacunación administrado</b>
15	Vómito	4m	Chihuahua	Sin vacunas
16	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	Sin vacunas
21	Vómito, diarrea mucoide y muerte	2m	Blue Heeler	Sin vacunas
30	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	Sin vacunas
34	Vómito y diarrea hemorrágica	3m	Schnauzer	Sin vacunas
54	Diarrea hemorrágica y muerte	4m	Coyote	Sin vacunas
62	Vómito y diarrea hemorrágica	2m	Pastor Alemán	Sin vacunas
81	Vómito	2m	Akita	Sin vacunas
90	Diarrea mucoide	2m	Pomeriano	Sin Vacunas
95	Vómito y diarrea hemorrágica	3m	Pitbull	Sin vacunas
107	Diarrea hemorrágica	3m	Golden Retriever	Cuadro de vacunación completo
114	Vómito, diarrea mucoide y muerte	4m	Rottweiler	Sin vacunas
127	Vómito y diarrea mucoide	7m	Border Collie	Sin vacunas
129	Sin signología	> 1a	Criollo	Cuadro de vacunación completo
142	Sin signología	> 1a	Criollo	Cuadro de vacunación completo

#### **4.9. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y PRESENTACIÓN DE CO-INFECCIONES**

Se ha demostrado la presencia de co-infecciones en las gastroenteritis agudas presentes en caninos, por lo que para nosotros era importante determinar si existía una asociación de la sintomatología con la presencia en forma individual y en co-infecciones de los virus que se estudiaron en este trabajo, aunado a la presencia de *Parvovirus canino*. Para ello, se analizaron los resultados obtenidos en un estudio previo realizado para el *Parvovirus canino* de las muestras utilizadas para este estudio (Cedillo-Rosales, 2019).

De las 150 muestras analizadas en el 18.6% no se detectaron virus, las que presentaron mono-infecciones fueron las siguientes: el 54.6% por CPV-2 (Cedillo-Rosales, 2019); en un 3.3% (5/150) se pudo detectar CBoV-1; en el 2% (3/150) se detectó CBoV-2. Por otro lado, en el 21.3 % (32/150) presentaron co-infección de uno o más virus, las cuales se describen en la tabla siguiente.

Las co-infecciones con más incidencia fueron las de dos virus, donde el 37.5 % (12/32) de las co-infecciones fue de CPV-2 con CBoV-1, de estas co-infecciones dobles el 21.8 % (7/32) fueron co-infecciones de CPV-2 con CCV, de igual forma el 21.8 % (7/32) eran co-infecciones de CPV-2 con CBoV-2 y el 3.1 % (1/32) fueron co-infecciones de CBoV-1 con CBoV-2 (1/32) (Tabla 14). También se presentaron co-infecciones de tres virus; CPV-2/CCV/CBoV-1 (3.1 %, (1/32)), CPV-2/CCV/CBoV-2 (3.1 %, (1/32)) y CPV-2/CBoV-1/CBoV-2 (6.2 %, (2/32)). Por último,

se detectó una sola co-infección (3.1 %, (1/32)) de los cuatro virus de estudio (CPV-2/CCV/CBoV-1/CBoV-2).

**Tabla 14. Resultados de las muestras procesadas**

<b>Tipo de infección</b>	<b>Virus asociados en la infección</b>	<b>Porcentaje de Co-infecciones</b>
<b>Negativos a infecciones</b>		18.6 % (28/150)
<b>Monoinfección</b>	CPV*	54.6 % (82/150)
	CCV	0 %
	CBoV-1	03.3 % (5/150)
	CBoV-2	02.0 % (3/150)
<b>Co-infecciones de 2 virus</b>	CPV-2, CBoV-1	08.0 % (12/150)
	CPV-2, CBoV-2	04.6 % (7/150)
	CPV-2, CCV	04.6 % (7/150)
	CBoV-1, CBoV-2	00.6 % (1/150)
<b>Co-infecciones de 3 virus</b>	CPV-2, CBoV-1, CBoV-2	01.3% (2/150)
	CPV-2, CCV, CBoV-1	00.6% (1/150)
	CPV-2, CCV, CBoV-2	00.6% (1/150)
<b>Co-infecciones de 4 virus</b>	CPV-2, CBoV-1, CBoV-2, CCV	00.6% (1/150)
<b>Total</b>		100% (150)
*(Cedillo-Rosales, 2019)		

Estas co-infecciones estuvieron presentes en caninos con la signología más grave que fueron vómito (24/32 co-infecciones), diarrea hemorrágica (20/32 co-infecciones) y muerte (11/32 co-infecciones) (Tabla 15).

**Tabla 15. Características y signología de caninos con gastroenteritis en el área metropolitana de Monterrey, N.L.**

<b>No. de muestra</b>	<b>Signología</b>	<b>Edad</b>	<b>Raza</b>	<b>Virus asociados en la co-infección</b>
5	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	2m	Criollo	CPV2, CCV
8	Vómito y diarrea hemorrágica	> 1a	Dashound	CPV2, CCV
15	Vómito	4m	Chihuahua	CPV2, CBoV2
16	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	CPV2, CBoV2
18	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	CPV2, CCV
19	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	CPV2, CCV
20	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Gran Danés	CPV2, CCV
21	Vómito, diarrea mucoide y muerte	2m	Blue Heeler	CPV2, CBoV2
22	Vómito y diarrea mucoide	3m	Pitbull	CPV2, CBoV1
24	Vómito y diarrea mucoide	3m	Criollo	CPV2, CCV
25	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	6m	Chihuahua	CPV2, CBoV1
28	Diarrea mucoide y muerte	3m	Pitbull	CPV2, CBoV1
30	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Pitbull	CPV2, CCV, CBoV1, CBoV2
34	Vómito y diarrea hemorrágica	3m	Schnauzer	CPV2, CCV, CBoV2
35	Diarrea hemorrágica y muerte	5m	Husky	CPV2, CBoV1
36	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	3m	Poodle	CPV2, CBoV1
37	Vómito y diarrea mucoide	4m	Criollo	CPV2, CBoV1
54	Diarrea hemorrágica y muerte	4m	Coyote	CPV2, CBoV2

60	Vómito y diarrea mucoide	3m	Beagle	CPV2, CBoV1
61	Vómito y diarrea hemorrágica	2m	Husky	CPV2, CBoV1
62	Vómito y diarrea hemorrágica	2m	Pastor Alemán	CPV2, CBoV1, CBoV2
69	Vómito y diarrea hemorrágica	4m	Pug	CPV2, CBoV1
81	Vómitos	2m	Akita	CPV2, CBoV1, CBoV2
90	Diarrea mucoide	2m	Pomeriano	CPV2, CBoV2
95	Vómito y diarrea hemorrágica	3m	Pitbull	CPV2, CBoV2
107	Diarrea hemorrágica	3m	Golden Retriever	CBoV1, CBoV2
108	Vómito y diarrea mucoide	2m	Cocker Spaniel	CPV2, CBoV1
109	Vómito y diarrea mucoide	4m	Husky	CPV2, CBoV1
111	Vómito, diarrea hemorrágica y muerte	2m	Pitbull	CPV2, CCV
114	Vómito, diarrea mucoide y muerte	4m	Rottweiler	CPV2, CBoV2
115	Diarrea hemorrágica y muerte	4m	Husky	CPV2, CBoV1
116	Vómito y diarrea hemorrágica	6m	Criollo	CPV2, CCV, CBoV1

#### **4.10. CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CCV Y CBoV Y LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD**

Fue determinada la correlación entre las variables y los virus de estudio con la prueba no paramétrica de Chi cuadrada utilizando el software WinEpi.

Las variables cualitativas que se tomaron en cuenta fueron la presencia de enfermedad (cualquier signología), la signología por separado (la presencia de

emesis, de diarrea mucoide y de diarrea hemorrágica) y también el fallecimiento del canino.

Se realizaron tablas de contingencia de 2X2 donde se estableció la correlación de cada una de las variables con la presencia de cada uno de los virus de estudio (Tabla 16).

**Tabla 16. Correlación de las variables cualitativas (signología y muerte de caninos) y la presencia de CBoV-1, CBoV-2 y CCV**

	Emesis		Diarrea mucoide		Diarrea hemorrágica		Muerte	
	$X^2$	$p$ -value	$X^2$	$p$ -value	$X^2$	$p$ -value	$X^2$	$p$ -value
<b>CBoV-1</b>	0.139	0.7089	0.001	0.9745	0.857	0.3545	~3.380	0.0660
<b>CBoV-2</b>	0.029	0.8644	0.718	0.3969	0.718	0.3969	~4.736	~0.0295
<b>CCV</b>	~5.854	~0.0155	~3.281	~0.0701	~13.124	~0.0003	~0.630	~0.4275

Las infecciones de *Circovirus canino* en las muestras no tuvieron relación significativa con la presencia de enfermedad ( $P = 0.1432$ ), con la presencia de vómito ( $P = 0.0155$ ;  $\chi^2$  no válida), con la presencia de diarrea mucoide ( $P = 0.0701$ ) al igual que con la presencia de diarrea hemorrágica ( $P = 0.0003$ ;  $\chi^2$  no válida), así como con la muerte del paciente ( $P = 0.4275$ ).



De igual forma, la presencia de infecciones con *Bocavirus canino tipo 1* no mostró una asociación significativa con la presencia de enfermedad ( $P = 0.6797$ ), con la presencia de vómitos ( $P = 0.7089$ ), la presencia de diarrea mucoide ( $P = 0.9745$ ), la presencia de diarrea hemorrágica ( $P = 0.3545$ ) y la muerte del paciente ( $P = 0.0660$ ).

Así mismo, las infecciones detectadas de *Bocavirus canino tipo 2* y las variables cualitativas analizadas en este estudio no tuvieron una relación significativa una vez analizadas con  $\chi^2$ . Aquí no hubo una relación significativa con la presencia de enfermedad ( $P = 0.7150$ ), la presencia de vómito ( $P = 0.8644$ ), con la presencia de diarrea mucoide ( $P = 0.3969$ ), con la presencia de diarrea hemorrágica ( $P = 0.3969$ ), ni con la muerte del paciente ( $P = 0.0295$ ;  $\chi^2$  no válida).

Por otro lado, se analizaron los resultados de las muestras que presentaban co-infecciones para establecer si había una asociación con las variables cualitativas a través de la prueba de  $\chi^2$ . En este caso, se tomó en cuenta como co-infección, la presencia de dos o más virus en las muestras, entre los virus están: *Parvovirus canino tipo 2* (CPV2) (Cedillo-Rosales, 2019), *Circovirus canino* (CCV), *Bocavirus canino tipo 1* (CBoV-1) y *Bocavirus canino tipo 2* (CBoV-2). Como variables cualitativas se tomaron en cuenta signología clínica presente en problemas relacionados con trastornos del tracto digestivo, entre ellos emesis, diarrea mucoide, diarrea hemorrágica y muerte del canino. Los resultados se observan en la tabla 17.

A través de este método, se estableció una asociación estadísticamente soportada de la presencia de co-infecciones y la presencia de vómito en el paciente en el cuadro entérico obteniendo un  $P = 0.0462$  (Tabla 17).

Por otro lado, la asociación entre co-infecciones y la presencia de diarrea mucoide no tuvo soporte estadístico ( $P = 0.2799$ ) (Tabla 17).

Sin embargo, si se estableció una correlación positiva entre la presencia de diarrea hemorrágica y la presentación de co-infección ( $P = 0.0007$ ) (Tabla 17).

Por último, la presentación de co-infección tiene una alta asociación significativa con la muerte del paciente ( $P = 0.0002$ ) según los datos obtenidos en este estudio (Tabla 17).

**Tabla 17. Correlación entre la signología y mortalidad de la enfermedad en caninos con la presentación de co-infecciones virales**

	Emesis		Diarrea mucoide		Diarrea hemorrágica		Muerte	
	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value
<b>Co-infección (≥ 2 virus)</b>	3.974	0.0462	1.167	0.2799	11.483	0.0007	13.991	0.0002

#### **4.11. RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICOS**

Para la secuenciación se utilizó el servicio de la empresa Macrogen y se enviaron a secuenciar 5 fragmentos obtenidos de los PCR y PCR anidado que se amplificaron

en los PCR, sin embargo, no se obtuvieron resultado de estas secuenciaciones que pudieran ser editados y para posteriormente realizar los análisis genéticos, probablemente por la cantidad de DNA obtenido de la purificación o probablemente por el grado de purificación por lo que estos estudios se repetirán.

## 5. DISCUSIÓN

El síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA), antes llamada gastroenteritis hemorrágica, es de los cuadros gastroentéricos más frecuentemente atendidos en la práctica veterinaria a nivel mundial, la cual tiene una elevada tasa de letalidad (Anderson et al., 2017). A pesar de que este síndrome no tiene una etiología exacta, en el 40-60 % de muestras diarreicas los virus juegan un papel importante en la presentación de la enfermedad (Caddy, 2018).

Por muchos años el *Parvovirus canino* ha sido el agente causante de la enfermedad más reconocido, sin embargo, virus emergentes están llamando la atención de los médicos veterinarios sumándose a la lista de los diferentes agentes etiológicos del SDHA (Anderson et al., 2017; Caddy, 2018).

En el área metropolitana de Monterrey los casos de gastroenteritis severas se diagnostican comúnmente, sin embargo, la identificación del agente causal no se establece siempre en todos los casos (comunicación personal). Dentro de los agentes etiológicos mayormente detectados y diagnosticados en esta área están la parasitosis, la diarrea por infecciones bacterianas (sin establecer género o especie) y las enfermedades virales con mayor prevalencia en el área y para las cuales existen pruebas rápidas (inmunocromatografías como SNAP) como el *Parvovirus canino*, *Coronavirus canino*, y el *Virus de Distemper canino* (Cedillo-Rosales, 2019; González-Vallejo, 2014).

En nuestra investigación se utilizaron muestras que previamente fueron analizadas para *Parvovirus canino*, diagnosticando en el 75.3% (113/150) *Parvovirus canino* tipo 2c y b a través de PCR, secuenciación y análisis genéticos (Cedillo-Rosales, 2019), por lo que junto con el resultado de nuestro estudio podemos concluir que CPV es el virus con más alta presencia en caninos con problemas gastroentéricos en Monterrey y su área metropolitana. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Anderson y colaboradores (2017) en Alemania (98% de positividad a CPV); Hao y colaboradores en China (2019) que detectaron en un PCR multiplex en el 70% de las muestras estudiadas CPV, así como un 54.3% de CPV-2 encontrado en Brazil en caninos sin protocolos de vacunación y con problemas gastrointestinales (Alves et al., 2018).

El *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* han sido reportados en diferentes partes del mundo causando gastroenteritis en caninos (Caddy, 2018). A la fecha no existen reportes de la presencia o prevalencia de *Circovirus canino* o *Bocavirus canino* en el área metropolitana de Monterrey e incluso en México, así mismo, se desconoce si estos virus juegan un papel importante en problemas gastrointestinales en caninos en esta área, por lo que los resultados de este trabajo serían el primer reporte de un estudio de presencia de estos virus en el área.

Para la detección o diagnóstico de enfermedades virales en caninos existen distintos tipos de pruebas en el mercado, siendo las más populares entre los clínicos por su rapidez y facilidad de uso, las inmunocromatografías (SNAP) para la detección de antígeno (comunicación personal de clínicos), tal es el caso de las

inmunocromatografías de CPV, CDV y CCoV, sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado la variabilidad en la sensibilidad de estas pruebas con respecto a la prueba de oro (aislamiento viral) o comparado con otras pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Schmitz, Coenen, König, Thiel, & Neiger, 1986). Por otro lado, aún no están disponibles comercialmente pruebas rápidas para la detección de CCV y CBoV.

En la actualidad, se ha descrito el aislamiento viral seguido de inmunodetección por inmumunoperoxidasa o inmunofluorescencia, tanto de CCV como de CBoV en algunas líneas celulares como MDCK o WCR como la prueba más sensible y de oro (gold standard) (Carmichael et al., 1994; Ohshima et al., 2010), sin embargo, no existe en todas las regiones de México la infraestructura y el personal capacitado para realizar este procedimiento, así mismo requiere de 3 y hasta 7 días para la obtención de los resultados. Por otro lado la Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una metodología altamente sensible y específica comparada con el aislamiento viral y que es utilizado en una gran cantidad de estudios para el diagnóstico de distintos tipos virales, por otro lado, la metodología puede realizarse en poco tiempo (Sykes, 2014).

Para el caso de *Circovirus canino*, en este estudio se utilizó como metodología diagnóstica la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En estudios previos se ha detectado la presencia de CCV utilizando tanto PCR punto final como PCR en tiempo real, con una alta sensibilidad y especificidad para la detección del CCV (Kotsias et al., 2019; L. Niu et al., 2020). La zona del genoma utilizada para el diseño

de los oligonucleótidos difiere entre autores, Hsu y colaboradores (2016) utilizaron la zona codificante para la proteína replicasa, al igual que Kotsias y colaboradores en 2019 por ser la región más conservada del virus. Otros autores utilizaron al igual que en este trabajo la proteína de la cápside para el diseño de oligonucleótidos, e incluso ambas zonas (Anderson et al., 2017; Van Kruiningen et al., 2019). En esta investigación se diseñaron oligonucleótidos que amplificaban un fragmento del genoma de 393 pb que corresponde a la proteína de la cápside, seguido de un PCR semianidado amplificando un fragmento de 227 pb de la misma proteína. Con el PCR y PCR anidado diseñado para este estudio se pudieron detectar segmentos del genoma de CCV en un porcentaje similar al descrito por otros autores (Anderson et al., 2017; Li, McGraw, et al., 2013).

Para el diagnóstico de *Bocavirus canino* tampoco existen pruebas rápidas que puedan evidenciar las infecciones por este virus, por lo que la metodología más utilizada para su diagnóstico y descrita en diferentes publicaciones es el PCR (Choi et al., 2016; Decaro, Amorisco, et al., 2012). En este estudio se estableció un PCR en punto final para amplificar un fragmento de 253 pb del gen que codifica para la proteína NP1 y otro fragmento de 110 pb del gen de la proteína NP1 para un PCR semianidado y así aumentar la sensibilidad de la prueba. De igual forma, el PCR para la detección de *Bocavirus canino tipo 2* amplificó un fragmento del gen de la proteína NP1 de 215 pb y para el PCR semianidado un fragmento de 112 pb de la proteína NP1. Hay estudios que reportan que los genes que codifican para la proteína NP1 del virus son altamente conservados (Choi et al., 2016). Algunos estudios previos reportan el diseño de oligonucleótidos que amplifican fragmentos

de las proteínas VP1 o VP2 (Choi et al., 2015; Amit Kapoor et al., 2012), sin embargo, en este trabajo se seleccionó el gen de la proteína NP1 para el diseño de los oligonucleótidos ya que el género *Bocavirus* es el único en la familia *Parvoviridae* que codifica esta proteína y así evitar la amplificación de falsos positivos en aquellas muestras positivas también a *Parvovirus canino tipo 2* (Fasina et al., 2017).

Las muestras analizadas en este estudio provienen de caninos que se presentaron a consulta por problemas gastroentéricos (125) y por otras razones (caninos sanos (25)) en clínicas de diferentes municipios del área metropolitana de Monterrey, entre ellos están: Apodaca, General Escobedo, Monterrey, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro y Santiago. La cantidad de muestras procedentes de cada municipio fue variable (3-73) y definida por la cantidad de casos clínicos que se presentaron en la etapa de muestreo. Por lo que, el lugar de procedencia no fue una variable significativa en este estudio.

En la presente investigación el 86.6% (130/150) de las muestras fueron de caninos menores a un año, de las cuales, el 24.6 % (32/130) resultaron positivas al menos a uno de los virus de estudio (CCV, CBoV-1, CBoV-2). El 13.4% (20/150) de las muestras fueron caninos mayores de un año, de estos el 25% (5/20) resultaron positivos a CBoV-1 (2/5) y CBoV-2 (2/5) siendo animales aparentemente sanos, solo uno de ellos (1/5) presentó una co-infección con CPV y CCV y sintomatología (vómito y diarrea hemorrágica), este canino, por otro lado, no presentó calendario de vacunación para CPV.



En este estudio la edad no tuvo soporte estadístico significativo como una variable asociada a la presentación de CCV o CBoV, probablemente por el tamaño de muestra utilizado en este estudio en cuanto animales adultos. Sin embargo, por las características de su replicación y el tipo de tejido que utilizan estos virus para ello, se ha establecido en otras investigaciones que los cachorros son más susceptibles a las infecciones por estos virus y que estos últimos pueden presentar sintomatología más grave (Choi et al., 2015; Kotsias et al., 2019; Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018). Por otro lado, un estudio en 2010 demostró que también los caninos adultos pueden ser infectados por CBoV, sin embargo, algunas infecciones son asintomáticas o con síntomas muy leves (Ohshima et al., 2010).

125 de 150 muestras utilizadas para este estudio fueron obtenidas de caninos que es presentaron a consulta a clínicas veterinarias del área metropolitana de Monterrey, N.L., y cuyo diagnóstico presuntivo fue parvovirus, de estas muestras el 78.7% de los caninos presentaron un protocolo incompleto de vacunación (1 sola vacunación) o no la presentaron. La vacunación de caninos en la zona incluye vacunas pentavalentes (CPV, CDV, CAV-1 y 2 y CPIV) mientras que la hexavalente además de los virus anteriores incluye la bacteria del género *Leptospira*. Además, se aplica la vacuna de Rabia y la de *Bordetella bronchiseptica*, en algunos casos. Los protocolos de vacunación varían, incluye entre 2 a 3 aplicando en la semana 16 de edad del cachorro el último refuerzo para la adquisición de una inmunidad adecuada, similar a lo que reportan algunos estudios publicados recientemente (Altman et al., 2017). En regiones con alta prevalencia de CPV se ha demostrado que protocolos de vacunación contra CPV disminuye la probabilidad de que los

cachorros se presenten a consulta por gastroenteritis, ya que la falta de esta se ha detectado como un factor de riesgo significativo para la infección y la presentación de gastroenteritis (Cedillo-Rosales, 2019; Altman et al., 2017). Por otro lado, no existe vacuna comercial que incluya cepas de CCV y CBoV, por lo que esta variable cualitativa (vacunación) no está relacionada en forma significativa con la presencia de estos virus en caninos en este estudio.

La sintomatología que presentaron los caninos fue variada, el 64.6% (97/150) presentaron emesis, el 36.6 % (55/150) presentaron una diarrea de tipo mucoide (pastosa, verdosa o amarillenta), de igual forma el 36.6 % de los caninos presentaron una diarrea hemorrágica abundante. El 15.3 % de los caninos fallecieron a causa de la enfermedad, de estos últimos el 56.6 % de los caninos que fallecieron presentaban una diarrea hemorrágica severa. Esta signología por sí sola no solo es atribuible a enfermedades virales, también infecciones bacterianas, enfermedades metabólicas, inflamatorias o parasitosis pueden ser asociadas a diarreas, sin embargo, los signos severos como diarrea hemorrágica abundante, emesis y muerte se han descrito en infecciones virales, sobre todo aquellas donde se presentan co-infecciones (Alves et al., 2018; Hao et al., 2019; Thaiwog et al 2016; Guo et al., 2016), especialmente en aquellas que reportaron la presencia de *Parvovirus canino*, *Circovirus canino* y *Bocavirus canino* (Bodewes et al., 2014; Li, McGraw, et al., 2013).

En el presente trabajo fue determinado un 6.6 % de positividad para *Circovirus canino*, un porcentaje relativamente bajo, comparado con el porcentaje de

positividad para CPV (Cedillo-Rosales, 2019). A pesar del bajo índice de positividad, estos resultados son similares a los resultados obtenidos en otros estudios realizados, donde el porcentaje de positividad para CCV era de 6.0-11.3 % (Anderson et al., 2017; Li, et al., 2013). Otros estudios demuestran en sus resultados una positividad más elevada que lo descrito en este trabajo, en China se reportó una positividad del 12.8 %; en Taiwán fue reportado un 20 % de positividad y en Italia se reportó un 31 % de positividad para CCV (Dowgier et al., 2017; Hsu et al., 2016; L. Niu et al., 2020). En el trabajo descrito por Dowgier y colaboradores en el 2017, donde el porcentaje de positividad para CCV ha sido el más elevado descrito hasta la fecha de animales sanos (28.35%) y enfermos (32.43%), y detectando en mayor proporción *Parvovirus canino* (CPV). En nuestro caso, no encontramos positividad a este virus en animales sanos, sin embargo, el número de muestras de animales sanos solo se limitó a 25 muestras. Por otro lado, tampoco se encontraron monoinfecciones por CCV de animales con sintomatología, además no hubo relación significativa entre la presencia del virus con la presencia de la enfermedad ( $P= 0.1432$ ). Sin embargo, Investigaciones similares a este trabajo también reportan la presencia de CCV en pacientes con gastroenteritis, pero no como el principal agente etiológico (Anderson et al., 2017; Kotsias et al., 2019; L. Niu et al., 2020). En contraste a estos resultados, existen reportes de CCV como único agente etiológico relacionado con la presencia de diarreas en caninos (Decaro et al., 2014; Hsu et al., 2016).

En este estudio, se detectó el CCV asociado en todos los casos con CPV-2 (10/150), un caso más además con CBoV-1, en otro caso en CBoV-2 y por último en una co-

infección con todos los virus antes mencionados, en todos estos casos se presentó signología clínica grave (vómito, diarrea hemorrágica) y en cuatro de los casos se presentó muerte. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dowgier y colaboradores (2017) y Li y colaboradores en el 2013. Sin embargo, se requieren más estudios de prevalencia para estimar la real distribución de CCV en las poblaciones caninas de la región, país y el mundo, así como mas investigación sobre el papel que desempeña este virus en la patología en problemas gastroentéricos.

El porcentaje de positividad para *Bocavirus canino tipo 1* en este trabajo de investigación fue de 14.6 %. A pesar de que CBoV-1 es un virus emergente y existen trabajos demostrando su patogenicidad en caninos y las investigaciones donde determinan su prevalencia son escasos. Por otro lado, el porcentaje de positividad para *Bocavirus canino tipo 2* fue del 10.0 %, cifras similares a las presentadas en investigaciones anteriores donde CBoV-2 presentaba un porcentaje de positividad de 4.5 – 9.5 % (Choi et al., 2015; Guo et al., 2016; Lau et al., 2012).

En este caso, también se presentaron infecciones de *Bocavirus canino tipo 1* y *Bocavirus canino tipo 2* en caninos sanos y caninos con SDHA, sin embargo, los análisis estadísticos con el número de muestras utilizados no mostraron una correlación específica entre la presencia de CBoV-1, CBoV-2 y la enfermedad ( $P=0.6797$ ;  $P=0.7150$  respectivamente). No obstante, no se han encontrado muchos reportes de monoinfecciones de CBoV-1 asociado con gastroenteritis. Sin embargo, existen reportes asociando a *Bocavirus canino tipo 1* como causante de enfermedad

al aislar el virus de un cachorro diagnosticado con una parvovirus inusual (Harrison, Styer, Pursell, Carmichael, & Nietfeld, 1992) y en 2010 se reportó un caso de un Yorkshire de edad avanzada (11 años) con una gastroenteritis severa donde se detectó solamente CBoV-1 (Ohshima et al., 2010). Por otra parte, la presencia de *Bocavirus canino tipo 2* también ha sido relacionada con la presencia de enteritis en caninos (Bodewes et al., 2014), donde CBoV-2 estaba presente en muestras de heces diarreicas pero presentando una co-infección con uno o varios patógenos (Guo et al., 2016; Lau et al., 2012), como se reporta en este trabajo.

De las muestras analizadas, se obtuvo una tasa de co-infección del 21.3 % (32/150), donde se distinguen los virus *Circovirus canino*, *Bocavirus canino tipo 1*, *Bocavirus canino tipo 2* y *Parvovirus canino tipo 2*. La presencia de co-infecciones en problemas gastrointestinales o respiratorios se ha reportado en los últimos años, estableciendo que la gravedad de los síntomas se ve relacionada con la presencia de estas. A este respecto, existen estudios donde la tasa de co-infección va desde el 68 % hasta el 100 % de las muestras (Guo et al., 2016; Li, McGraw, et al., 2013; L. Niu et al., 2020). Dentro de las 32 muestras con co-infecciones detectadas en este estudio, el 84.3 % fueron co-infecciones de dos virus, siendo CPV-2 el virus más frecuente, coincidiendo con investigaciones anteriores donde mencionan que el virus prevalente en co-infecciones es el CPV-2 (Anderson et al., 2017; Guo et al., 2016; Kotsias et al., 2019; L. Niu et al., 2020; Thaiwong et al., 2016). Además, el 17.8 % de las co-infecciones fueron duales (CPV-2/CBoV-1 (8%); CPV-2/CBoV-2 (4.6%); CPV-2/CCV (4.6%); CBoV-1/CBoV-2 (0.6%)), mientras que 2.5% de las infecciones fueron de tres virus (CPV-2/CBoV-1/CBoV-2 (1.3%); CPV-2/CCV/CBoV-

1 (0.6%); CPV-2/CCV/CBoV-2 (0.6%)) y una sola muestra (0.6%) presentó co-infección con 4 virus (CPV-2/CBoV-1/CBoV-2/CCV). Las co-infecciones virales en casos de gastroenteritis hemorrágica aguda se han reportado con mayor frecuencia en los últimos años, encontrándose CPV, CCoV, CAV, CDV, CCV, CBoV, CRV entre los más frecuentes (Choi et al., 2015; L. Niu et al., 2020).

En este estudio se detectaron a partir de muestras clínicas CCV, CBoV-1 y 2 además de CPV detectado en un trabajo previo (Cedillo-Rosales, 2019), en esta zona donde se diagnostica en clínicas con mayor frecuencia el CPV. Sin embargo, hasta el momento se desconocía la presencia de CCV y CBoV.

En la presente investigación se analizó la correlación entre la presencia de co-infecciones y la signología (emesis, diarrea hemorrágica y muerte). Se determinó que la presencia de co-infección está significativamente correlacionada con la presencia de emesis ( $P= 0.0462$ ), con la presencia de diarrea hemorrágica ( $P=0.0007$ ) y por último que las co-infecciones están altamente relacionadas con la letalidad de la enfermedad ( $P= 0.0002$ ). Esto mismo se ha descrito anteriormente en 2016 por Thaiwong y colaboradores, donde describió el caso de una camada de cachorros que presentaron diarrea hemorrágica y muerte súbita, infectados por CPV-2 y CCV. Anderson y colaboradores en 2017 reportaron que las co-infecciones de CPV-2 con CCV presentaban una tasa de letalidad más elevada que los pacientes que solo presentaban mono-infecciones. A este respecto, se pudo establecer una asociación significativa entre la presencia de co-infecciones y la presencia de enfermedad, es decir, se pudo detectar en las muestras que

presentaban este tipo de co-infecciones múltiples provenían de caninos que presentaban un cuadro hiperagudo de gastroenteritis hemorrágica aguda y algunos murieron a los pocos días de presentar signología como lo reportaron otros investigadores (Choi et al., 2015; L. Niu et al., 2020).

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se estableció un protocolo de PCR mediante el diseño de controles positivos (sondas sintéticas) y oligonucleótidos de regiones específicas del genoma de los virus de estudios, que permitió detectar la presencia de los virus CCV, CBoV-1 y CBoV-2, siendo una herramienta sensible y específica, que se puede poner a disposición de los clínicos para esclarecer la etiología multifactorial de los problemas gastroentéricos en caninos que se presenten a consulta y mejorar los protocolos de tratamiento.

Con este método se estableció la presencia de *Circovirus canino* en un 6.6%, en caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L. asociado principalmente con *Parvovirus canino* en animales con problemas gastroentéricos que se presentaron a consulta en clínicas veterinarias ubicadas en el área de estudios.

Por otro lado, se ha logrado detectar la presencia a través de PCR de *Bocavirus canino tipo 1* en un 14.66% y de *Bocavirus canino tipo 2* en un 10% tanto en animales aparentemente sanos y en animales con gastroenteritis que se presentaron a consulta en clínicas ubicadas en Monterrey y su área metropolitana, por lo que por sí solos, en nuestro estudio no resultó significativa la presencia del virus y la presentación de la enfermedad (signología).



Así mismo, se ha establecido una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de co-infecciones (CCV, CBoV, CPV) y la sintomatología clínica más grave de gastroenteritis hemorrágica aguda (emesis, enteritis hemorrágica y muerte).

El 17.8 % de las co-infecciones fueron duales (CPV-2/CBoV-1 (8%); CPV-2/CBoV-2 (4.6%); CPV-2/CCV (4.6%); CBoV-1/CBoV-2 (0.6%)), mientras que 2.5% de las infecciones fueron de tres virus (CPV-2/CBoV-1/CBoV-2 (1.3%); CPV-2/CCV/CBoV-1 (0.6%); CPV-2/CCV/CBoV-2 (0.6%)) y una sola muestra (0,6%) presentó co-infección con 4 virus (CPV-2/CBoV-1/CBoV-2/CCV).

De acuerdo con los resultados de este estudio, se acepta la hipótesis que afirma que el *Circovirus canino* y el *Bocavirus canino* se encuentran presentes en la población canina del área metropolitana de Monterrey, N.L., y en co-infecciones con CPV están asociados con la presentación de gastroenteritis hemorrágica aguda.

## 7. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

- Allan, G. M., & Ellis, J. A. (2000). Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(1), 3–14.  
<https://doi.org/10.1177/104063870001200102>
- Altman, K. D., Kelman, M., & Ward, M. P. (2017). Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Veterinary Microbiology*, 210, 8–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.019>
- Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alves, C., Granados, O., Budaszewski, R., Streck, A. F., Weber, M. N., Cibulski, S. P., Pinto, L. D., Ikuta, N., & Canal, C. W. (2018). Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage. *Brazilian journal of microbiology*. 49(4), 790–794.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.006>
- Anderson, A., Hartmann, K., Leutenegger, C. M., Proksch, A. L., Mueller, R. S., & Unterer, S. (2017). Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Veterinary Record*, 180(22), 1–5. <https://doi.org/10.1136/vr.103926>

- Berns K. I., y Parrish C. R. (2013). "Parvoviridae". En Knipe D. M y Howley P. M. (Ed.), *Fields Virology* Vol. II (pp 1768-1787). Philadelphia, PA, EUA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS
- Blackburn, S. D., Cline, S. E., Hemming, J. P., & Johnson, F. B. (2005). Attachment of bovine parvovirus to O-linked alpha 2,3 neuraminic acid on glycophorin A. *Archives of Virology*, 150(7), 1477–1484. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0496-y>
- Bodewes, R., Lapp, S., Hahn, K., Habierski, A., Förster, C., König, M., ... Baumgärtner, W. (2014). Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.025>
- Caddy, S. L. (2018). New viruses associated with canine gastroenteritis. *The Veterinary Journal*, 232, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.009>
- Cao, J., Lin, C., Wang, H., Wang, L., Zhou, N., Jin, Y., & Liao, M. (2015). Circovirus Transport Proceeds via Direct Interaction of the Cytoplasmic Dynein IC1 Subunit with the Viral Capsid Protein. *Journal of Virology*, 89(5), 2777–2791. <https://doi.org/10.1128/JVI.03117-1>
- Carmichael, L. E., Schlafer, D. H., & Hashimoto, A. (1994). Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and Seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest*, 6, 165–174.

- Cedillo, Rosales D. (2019). *Caracterización genética de cepas de Parvovirus canino presentes en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Gral. Escobedo, Nuevo León.
- Cheung, A. K. (2015). Specific functions of the Rep and Rep' proteins of porcine circovirus during copy-release and rolling-circle DNA replication. *Virology*, 481, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.004>
- Choi, J. W., Jung, J. Y., Lee, J. Il, Lee, K. K., & Oem, J. K. (2016). Molecular characteristics of a novel strain of canine minute virus associated with hepatitis in a dog. *Archives of Virology*, 161(8), 2299–2304. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2895-7>
- Choi, J. W., Lee, K. H., Lee, J. Il, Lee, M. H., Lee, K. K., & Oem, J. K. (2015). Genetic characteristics of canine bocaviruses in Korean dogs. *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.023>
- Crowther, R. A., Berriman, J. A., Curran, W. L., Allan, G. M., & Todd, D. (2003). Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *Journal of Virology*, 77(24), 13036–13041. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.24.13036>
- Decaro, N., Amorisco, F., Lenoci, D., Lovero, A., Colaianni, M. L., Losurdo, M., Buonavoglia, C. (2012). Molecular characterization of Canine minute virus associated with neonatal mortality in a litter of Jack Russell terrier dogs. *Journal*

of *Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(4), 755–758.

<https://doi.org/10.1177/1040638712445776>

Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Lanave, G., Circella, E., Cavalli, A., ... Buonavoglia, C. (2014). Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105909>

Dowgier, G., Lorusso, E., Decaro, N., Desario, C., Mari, V., Lucente, M. S., ... Elia, G. (2017). A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Veterinary Microbiology*, 204, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.007>

Dudleenamjil, E. (2009). *BPV Entry and Trafficking in EBTr Cells*. (Tesis de Doctorado). Brigham Young University, Provo, Utah

EditSeq™. Version 15.0. DNASTAR. Madison, WI

Fasina, O. O., Stupps, S., Figueroa-Cuilan, W., & Pintel, D. J. (2017). Minute Virus of Canines NP1 Protein Governs the Expression of a Subset of Essential Nonstructural Proteins via Its Role in RNA Processing. *Journal of Virology*, 91(12). <https://doi.org/10.1128/JVI.00260-17>

Fort, M., Sibila, M., Nofrarías, M., Pérez-martín, E., Olvera, A., Mateu, E., & Segalés, J. (2010). Veterinary Immunology and Immunopathology Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-

mediated immunity upon PCV2 infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(3–4), 226–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.05.013>

Gonzalez, Vallejo M. V. (2014). *Detección molecular de virus asociados con el complejo respiratorio canino en perros del área metropolitana de Monterrey*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Gral. Escobedo, Nuevo León.

Guido, M., Tumolo, M. R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., Giorgi, M. De, ... Giorgi, M. De. (2016). Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterology*, 22(39), 8684–8697.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8684>

Guo, D., Wang, Z., Yao, S., Li, C., Geng, Y., Wang, E., ... Sun, D. (2016). Epidemiological investigation reveals genetic diversity and high co-infection rate of canine bocavirus strains circulating in Heilongjiang province, Northeast China. *Research in Veterinary Science*, 106, 7–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.003>

Gurda, B. L., Parent, K. N., Bladdek, H., Sinkovits, R. S., Dimattia, M. A., Rence, C., ... Agbandje-mckenna, M. (2010). Human Bocavirus Capsid Structure: Insights into the Structural Repertoire of the Parvoviridae. *Journal of Virology*, 84(12), 5880–5889. <https://doi.org/10.1128/JVI.02719-09>

- Hao, X., Liu, R., He, Y., Xiao, X., Xiao, W., Zheng, Q., Lin, X., Tao, P., Zhou, P., & Li, S. (2019). Multiplex PCR methods for detection of several viruses associated with canine respiratory and enteric diseases. *PLoS ONE*, 14(3), e0213295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213295>
- Huang, L.-Y., Halder, S., & Agbandje-McKenna, M. (2015). Parvovirus Glycan Interactions. *Current Opinion in Virology*, 7, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.05.007>
- Hsu, H. S., Lin, T. H., Wu, H. Y., Lin, L. S., Chung, C. S., Chiou, M. T., & Lin, C. N. (2016). High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 8–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0722-8>
- Johnson, F. B., Fenn, L. B., Owens, T. J., Faucheux, L. J., & Blackburn, S. D. (2004). Attachment of bovine parvovirus to sialic acids on bovine cell membranes. *Journal of General Virology*, 85, 2199–2207. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79899-0>
- Kailasan, S., Halder, S., Gurda, B., Bladek, H., Chipman, P. R., McKenna, R., ... Agbandje-McKenna, M. (2015). Structure of an Enteric Pathogen, Bovine Parvovirus. *Journal of Virology*, 89(5), 2603–2614. <https://doi.org/10.1128/jvi.03157-14>
- Kapoor, A., Dubovi, E. J., Henriquez-Rivera, J. A., & Lipkin, W. I. (2012). Complete Genome Sequence of the First Canine Circovirus. *Journal of Virology*, 86(12), 7018–7018. <https://doi.org/10.1128/JVI.00791-12>

- Kapoor, Amit, Mehta, N., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Govindasamy, L., Medina, J. L., ... Lipkin, W. I. (2012). Communication Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. *Journal of General Virology*, 93, 341–346. <https://doi.org/10.1099/vir.0.036624-0>
- Kotsias, F., Bucafusco, D., Nuñez, D. A., Lago Borisovsky, L. A., Rodriguez, M., & Bratanich, A. C. (2019). Genomic characterization of canine circovirus associated with fatal disease in dogs in South America. *PLoS ONE*, 14(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218735>
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Yeung, H. C., Teng, J. L. L., Wu, Y., Bai, R., ... Yuen, K. (2012). Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus. *Journal of General Virology*, 93, 1573–1582. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042531-0>
- Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C. M., Marks, S. L., Kubiski, S., ... Pesavento, P. A. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), 534–541. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121390>
- Li, L., Pesavento, P. A., Leutenegger, C. M., Estrada, M., Coffey, L. L., Naccache, S. N., ... Delwart, E. (2013). A novel bocavirus in canine liver. *Virology Journal*, 10, 2–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-54>



- Manteufel, J., & Truyen, U. (2008). Animal Bocaviruses: A Brief Review. *Intervirology*, 51, 328–334. <https://doi.org/10.1159/000173734>
- MegAlign™. DNASTAR. Madison, WI
- Misinzo, G., Delputte, P. L., Meerts, P., Lefebvre, D. J., & Nauwynck, H. J. (2006). Porcine Circovirus 2 Uses Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate B Glycosaminoglycans as Receptors for Its Attachment to Host Cells. *Journal of Virology*, 80(7), 3487–3494. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3487>
- Nauwynck, H. J. (2005). Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *Journal of General Virology*, 86, 2057–2068. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80652-0>
- Niu, J., Yi, S., Wang, H., Dong, G., Zhao, Y., Guo, Y., ... Wang, K. (2019). Complete genome sequence analysis of canine bocavirus 1 identified for the first time in domestic cats. *Archives of Virology*, 164(2), 601–605. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4096-z>
- Niu, L., Wang, Z., Zhao, L., Wang, Y., Cui, X., Shi, Y., ... Ge, J. (2020). Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014–2016. *Archives of Virology*, 165(1), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04433-4>
- Oh, J. S., Ha, G. W., Cho, Y. S., Kim, M. J., An, D. J., Hwang, K. K., ... Song, D. S. (2006). One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to

canine parvovirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(4), 520–524.

<https://doi.org/10.1128/CVI.13.4.520-524.2006>

Ohshima, T., Kawakami, K., Abe, T., & Mochizuki, M. (2010). A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. *Veterinary Microbiology*, 145(3–4), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.033>

Pénzes, J. J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübinger, A. M., Hughes, J., Cotmore, S. F., & Harrach, B. (2020). Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Archives of Virology*, 3(0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>

Piewbang, C., Jo, W. K., Puff, C., Ludlow, M., van der Vries, E., Banlunara, W., ... Osterhaus, A. D. M. E. (2018). Canine Bocavirus Type 2 Infection Associated With Intestinal Lesions. *Veterinary Pathology*, 1(8). <https://doi.org/10.1177/0300985818755253>

Piewbang, C., Jo, W. K., Puff, C., Van Der Vries, E., Kedsangakonwut, S., Rungsipipat, A., ... Osterhaus, A. D. M. E. (2018). Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25936-1>

Porwal, M., Cohen, S., Snoussi, K., Popa-Wagner, R., Anderson, F., Dugot-Senant, N., ... Kann, M. (2013). Parvoviruses Cause Nuclear Envelope Breakdown by

Activating Key Enzymes of Mitosis. *PLoS Pathogens*, 9(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003671>

PrimerSelect™. Version 15.0. DNASTAR. Madison, WI

Qu, X. W., Liu, W. P., Qi, Z. Y., Duan, Z. J., Zheng, L. S., Kuang, Z. Z., ... Hou, Y. De. (2008). Phospholipase A2-like activity of human bocavirus VP1 unique region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.164>

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., & Jestin, A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1–2), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.002>

Schildgen, O., Qiu, J., & Söderlund-Venermo, M. (2012). Genomic features of the human bocaviruses. *Future Virol.* 7(1), 31–39.

Sykes J. E. y Rankin S.C. (2014). “*Isolation in Cell Culture*”. En Sykes J. E. (Ed.). “*Canine and Feline INFECTIOUS DISEASES*” (pp. 2-9). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier Saunders.

Sykes J. E. y Rankin S.C. (2014). “Nucleic Acid Detection Assays”. En Sykes J. E. (Ed.). “*Canine and Feline INFECTIOUS DISEASES*” (pp. 37-45). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier Saunders.

Thaiwong, T., Wise, A. G., Maes, R. K., Mullaney, T., & Kiupel, M. (2016). Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual

- Infections in a Papillon Breeding Colony. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1204–1209. <https://doi.org/10.1177/0300985816646430>
- Van Kruiningen, H. J., Heishima, M., Kerr, K. M., Garmendia, A. E., Helal, Z., & Smyth, J. A. (2019). Canine circoviral hemorrhagic enteritis in a dog in Connecticut. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(5), 732–736. <https://doi.org/10.1177/1040638719863102>
- Vanacker, J., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V., & Rommelaere, J. (1996). Transactivation of a Cellular Promoter by the NS1 Protein of the Parvovirus Minute Virus of Mice through a Putative Hormone-Responsive Element. *Journal of Virology* 70(4), 2369–2377.
- Walia, R., Dardari, R., Chaiyakul, M., & Czub, M. (2014). Porcine circovirus-2 capsid protein induces cell death in PK15 cells. *Virology*, 468–470, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.051>
- Yi, C., Bi, J., Cao, H., Zhao, G., Zhang, H., Jin, N., ... Wei, X. (2018). The detection of canine circovirus in Guangxi, China. *Virus Research*, 259, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.10.021>
- Yun Chen, A., & Qiu, J. (2011). Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest. *Future Virol.* 5(6), 731–743. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.56>
- Zaccaria, G., Malatesta, D., Scipioni, G., Di Felice, E., Campolo, M., Casaccia, C., ... Lorusso, A. (2016). Circovirus in domestic and wild carnivores: An important

opportunistic agent? *Virology*, 490, 69–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.007>

Zhai, S. L., Lin, T., Chen, Y. W., Liu, R., Lv, D. H., Wen, X. H., ... Wei, W. K. (2017). First complete genome sequence of canine bocavirus 2 in mainland China. *New Microbes and New Infections*, 18, 47–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.04.002>

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

Nombre del dueño:		Fecha:
Nombre mascota:	Sexo:	Raza:
Edad:	Clínica de procedencia:	Municipio de origen:
Teléfono clínica:		

Marque con una X en donde corresponda y conteste lo que se le pide.

SIGNOLOGÍA				
	SI	NO	TIPO	DÍAS CON SÍNTOMA
Diarrea				
Vómito				
Deshidratación				
Pérdida de consciencia				
Muerte				
Otros				
Comentarios				
INMUNIZACIÓN				
	SI	NO	Tipo de vacuna utilizada y marca comercial	Dosis aplicadas, intervalo de aplicación, edad inicio calendario
Tiene vacunas				
Comentarios				
	SI	NO	Marca comercial de desparasitante	Dosis aplicadas, intervalo de aplicación, edad inicio
Desparasitaciones				
Comentarios				
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS				
	SI	NO	Diagnóstico presuntivo	Pruebas de laboratorio realizadas y resultados sobresalientes de las pruebas
Diagnóstico presuntivo				
Se utilizó snap para CPV y otros virus			Marca de prueba y Resultado	
Comentarios				
TIPO DE MUESTRA TOMADA, MEDIO DE TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN				

**ANEXO 2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE CANINOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY**

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Nombre</b>	Chicharito	Matilda	Lia	Rocky	Milly	Bruno	Dangy	Nano	S/N	Canela
<b>Sexo</b>	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra
<b>Raza</b>	Beagle	Labrador	Husky	Criollo	Criollo	Border Collie	Pitbull	Dashound	Shihtzu	Chihuahua
<b>Edad</b>	5m	5m	4m	2m	2m	4m	3m	1a 5m	3m	4m
<b>Procedencia</b>	San Pedro	San Pedro	San Nicolás	San Pedro	Salinas Victoria	Escobedo	Salinas Victoria	San Nicolás	Salinas Victoria	San Nicolás
<b>Vacunación</b>	Completa	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
<b>Vómitos</b>	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Diarrea</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Tipo de diarrea</b>	Hemorrágica	Hemorrágica	Pastosa	Sin definir	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica
<b>Muerte</b>	No	Si	No	Desconocido	Si	No	No	No	No	Desconocido
<b>PCR CCV (+)</b>	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	No
<b>PCR CBoV1 (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CBoV2 (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CPV2 (+)</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Nombre	Pancho	Grace	Nena	Gorda	Jerry	Bombon	Milo	Rusa	Cordoves	Lituania
Sexo	Macho	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Raza	Criollo	Mastin Napolitano	Boston Terrier	Pitbull	Chihuahua	Pitbull	Cocker Spaniel	Gran Danés	Gran Danés	Gran Danés
Edad	3m	4m	5m	3m	3m	3m	5m	6m	6m	6m
Procedencia	Monterrey	San Pedro	Escobedo	Escobedo	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Escobedo	Escobedo	Escobedo
Vacunación	Incompleta	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Incompleta	Incompleta
Vómitos	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Diarrea	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	Líquida	Verdosa	Hemorrágica	Hemorrágica	No Aplica	Hemorrágica	No Aplica	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica
Muerte	No	No	No	Desconocido	No	Si	No	No	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si



DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<b>Nombre</b>	S/N	Dipci	Choco	Oso	Bombon	Satan	Rayo	Puchi	Coqueta	S/N
<b>Sexo</b>	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho
<b>Raza</b>	Blue Heeler	Pitbull	Cocker Spaniel	Criollo	Chihuahua	Pitbull	Pastor Belga	Pitbull	Pitbull	Pitbull
<b>Edad</b>	2m	3m	2m	3m	6m	5m	3m	3m	3m	3m
<b>Procedencia</b>	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
<b>Vacunación</b>	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
<b>Vómitos</b>	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	No	Si	Si
<b>Diarrea</b>	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si
<b>Tipo de diarrea</b>	Amarillenta	Amarillenta	Café	Café	Hemorrágica	No Aplica	Hemorrágica	Amarillenta	Café	Hemorrágica
<b>Muerte</b>	Si	No	No	No	Si	No	Si	Si	Si	Si
<b>PCR CCV (+)</b>	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	Si
<b>PCR CBoV1 (+)</b>	No	Si	No	No	Si	No	No	Si	No	Si
<b>PCR CBoV2 (+)</b>	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
<b>PCR CPV2 (+)</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<b>Nombre</b>	Linda	Malu	S/N	Doker	Kira	Fonky	Tita	Luna	Princesa	Gorda
<b>Sexo</b>	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra
<b>Raza</b>	French Poodle	Criollo	Dashound	Schnauzer	Husky	French Poodle	Criollo	Pitbull	Criollo	Criollo
<b>Edad</b>	2m	4m	3m	3m	5m	3m	4m	4m	3m	5m
<b>Procedencia</b>	San Nicolás	San Nicolás	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
<b>Vacunación</b>	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
<b>Vómitos</b>	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Diarrea</b>	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
<b>Tipo de diarrea</b>	Líquida	Líquida	No Aplica	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica	Café	No Aplica	No Aplica	Hemorrágica
<b>Muerte</b>	Desconocido	Desconocido	No	No	Si	Si	No	No	No	No
<b>PCR CCV (+)</b>	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CBoV1 (+)</b>	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No
<b>PCR CBoV2 (+)</b>	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CPV2 (+)</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
<b>Nombre</b>	Bethoven	Pelusa	Nikita	Lipanto	Penqui	Yanqui	Ruffo	Bolo	Negro	Momo
<b>Sexo</b>	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
<b>Raza</b>	Criollo	Pastor Belga	Criolla	Doberman	Chihuahua	Criollo	Husky	Chihuahua	Pastor Alemán	Criollo
<b>Edad</b>	4m	3m	3m	9m	3m	3m	4m	5m	3m	6m
<b>Procedencia</b>	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	San Pedro	San Pedro	Escobedo
<b>Vacunación</b>	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta
<b>Vómitos</b>	No	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Diarrea</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si
<b>Tipo de diarrea</b>	Café	Verdosa	Amarillenta	Hemorrágica	Hemorrágica	Amarillenta	No Aplica	Amarillenta	Hemorrágica	Amarillenta
<b>Muerte</b>	No	No	No	No	Si	No	Si	No	Si	Si
<b>PCR CCV (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CBoV1 (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CBoV2 (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CPV2 (+)</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
<b>Nombre</b>	Greasy	Lobo	Chuly	Sin Nombre	Sin Nombre	Sin Nombre	Dino	Capri	Chalino	Maqui
<b>Sexo</b>	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Raza</b>	Pitbull	Criollo	Chihuahua	Coyote	Coyote	Coyote	Pitbull	Criollo	Chihuahua	Beagle
<b>Edad</b>	3m	3m	2m	4m	4m	4m	3m	5m	10m	3m
<b>Procedencia</b>	Escobedo	Escobedo	San Pedro	Apodaca	Apodaca	Apodaca	Monterrey	Monterrey	San Pedro	Monterrey
<b>Vacunación</b>	Incompleta	Incompleta	Incompleta	No Aplica	No Aplica	No Aplica	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta
<b>Vómitos</b>	Si	No	Si	No	Si	Si	Si	No	Si	Si
<b>Diarrea</b>	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si
<b>Tipo de diarrea</b>	Café	Café	Hemorrágica	Hemorrágica	No Aplica	No Aplica	Hemorrágica	Líquida	Hemorrágica	Líquida
<b>Muerte</b>	No	Si	No	Si	No	No	Desconocido	Desconocido	No	Desconocido
<b>PCR CCV (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CBoV1 (+)</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
<b>PCR CBoV2 (+)</b>	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
<b>PCR CPV2 (+)</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Nombre	Lobo	Rony	Luna	Bruno	Tyson	Spike	Taco	Drako	Dolly	Rocko
Sexo	Macho	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho
Raza	Husky	Pastor Alemán	Shihtzu	Poodle	Pitbull	Chihuahua	Criollo	Criollo	Pug	Pastor Belga
Edad	2m	2m	2m	6m	2m	3m	3m	4m	4m	4m
Procedencia	Monterrey	Escobedo	Escobedo	San Pedro	San Pedro	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
Vómitos	Si	Si	Si	No	Si	No	Si	Si	Si	No
Diarrea	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	Hemorrágica	Hemorrágica	Obscura	Hemorrágica	Hemorrágica	Amarillenta	Amarillenta	Hemorrágica	Hemorrágica	Hemorrágica
Muerte	Desconocido	Desconocido	Desconocido	No	No	Si	No	No	Desconocido	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No
PCR CBoV2 (+)	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Nombre	Estrella	Akira	Manotas	Julieta	S/N	Lucho	Nina	Chuchis	Coco	Luna
Sexo	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Hembra
Raza	Bull Terrier	Pitbull	Pastor Alemán	Pomeriano	Labrador	Criollo	Criollo	Criollo	Poodle	Chihuahua
Edad	5m	4m	10m	3m	5m	3m	4m	3m	2m	5m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Escobedo	San Nicolás	Salinas Victoria	Monterrey	Monterrey	Escobedo	Monterrey	Salinas Victoria
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
Vómitos	No	Si	Si	No	Si	Si	No	Si	No	Si
Diarrea	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	Café	No Aplica	Hemorrágica	Mucoide	Hemorrágica	Líquida	Hemorrágica	Hemorrágica	Líquida	Líquida
Muerte	No	No	Desconocido	No	Desconocido	Desconocido	Desconocido	No	Desconocido	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Nombre	Sky	Junior	Duque	Lilo	Sofía	Cody	Aikman	Kimbo	Romina	Antar
Sexo	Macho	Macho	Macho	Hembra	Hembra	Macho	MAcho	Macho	Hembra	Macho
Raza	Akita	Criollo	Husky	Bull Dog Frances	Pug	Criollo	Rottweiler	Pitbull	Labrador mix	Pomeriano
Edad	2m	3m	3m	5m	6m	4m	7m	9m	3m	2m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Santiago	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Escobedo	Escobedo	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Incompleta	Incompleta
Vómitos	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	Si	Si	No
Diarrea	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si
Tipo de diarrea	No Aplica	Líquida	Hemorrágica	Hemorrágica	Amarillenta	Líquida	Hemorrágica	Café	No Aplica	Mucoide
Muerte	No	Desconocido	No	No	Desconocido	Desconocido	No	No	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
PCR CPV2 (+)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Nombre	Cuchufleta	Dino	Roko	Hanny	Luna	Yuky	Talía	Lucas	Roy	Ojitos
Sexo	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho
Raza	Criollo	Criollo	Criollo	Pug	Pitbull	Criollo	Pastor Belga	Chihuahua	Labrador	Pug
Edad	4m	4m	3m	4m	3m	6m	2m	2m	3m	3m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta
Vómitos	No	Si	Si	No	Si	Si	No	No	Si	Si
Diarrea	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	Amarillenta	Amarillenta	No Aplica	No Aplica	Hemorrágica	No especifica	Hemorrágica	Mucoide	Hemorrágica	Amarillenta
Muerte	No	No	No	No	Desconocido	No	No	No	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si



DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Nombre	Tribi	Belcam	Toti	Pam	Firus	Chiquis	Alicay	Lucas	Duky	Niño
Sexo	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho
Raza	Pastor Belga	Husky	Pitbull	Pomeriano	Criollo	Chihuahua	Golden Retriever	Cocker Spaniel	Husky	Pitbull
Edad	3m	2m	3m	2m	3m	5m	3m	2m	4m	3m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Monterrey	Monterrey	Monterrey	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Incompleta	Completa	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta
Vómitos	Si	Si	Si	No	No	Si	No	Si	Si	Si
Diarrea	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
Tipo de diarrea	Hemorrágica	Hemorrágica	No Aplica	No Aplica	Líquida	Líquida	Hemorrágica	Pastosa	Amarillenta	No Aplica
Muerte	No	No	Desconocido	No	Desconocido	No	Desconocido	No	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No
PCR CPV2 (+)	No	Si	Si	No	Si	No	No	Si	Si	Si

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Nombre	Tracy	Paco	Laika	Molly	S/N	Luna	Rulo	Poli	Percy	Zeus
Sexo	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho
Raza	Pitbull	Chihuahua	Chihuahua	Rottweiler	Husky	Criollo	Beagle	Chihuahua	Beagle	Husky
Edad	2m	3m	9m	4m	4m	6m	5m	4m	3m	5m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Monterrey	Monterrey	San Nicolás	San Nicolás
Vacunación	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa
Vómitos	Si	Si	No	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si
Diarrea	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	Hemorrágica	No Aplica	No Aplica	Líquida	Hemorrágica	Hemorrágica	Líquida	Hemorrágica	Mucoide	Hemorrágica
Muerte	Si	Desonocido	No	Si	Si	No	Desconocido	Desconocido	Si	No
PCR CCV (+)	Si	No	No	No	No	Si	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	Si	No	Si	Si	Si	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	Si	No	No	Si	Si	Si	No	Si	Si	No

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Nombre	Rognar	S/N	S/N	S/N	Balvin	Hana	Roma	Milo	S/N	S/N
Sexo	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Border Collie	Macho	Hembra	Hembra
Raza	Rottweiler	Criollo	Lobo	Lobo	Pug	Criollo	Hembra	Cocker Spaniel	Criollo	Criollo
Edad	4m	Noenato	4m	4m	3m	4m	7m	4m	> 1a	> 1a
Procedencia	San Nicolás	Monterrey	Santiago	Santiago	San Nicolás	San Nicolás	San Nicolás	San Nicolás	Escobedo	Escobedo
Vacunación	Completa	Incompleta	No Aplica	No Aplica	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Incompleta	Completa	Completa
Vómitos	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	No	No
Diarrea	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	No	No
Tipo de diarrea	Hemorrágica	Hemorrágica	No Aplica	No Aplica	Líquida	Líquida	Líquida	Líquida	No Aplica	No Aplica
Muerte	Si	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	No	No	Si	No	Si	No
PCR CPV2 (+)	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	No

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Nombre	Deme	S/N	Camila	Pita	Blanquita	Bruno	S/N	Pato	Carlota	Brandy
Sexo	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Hembra
Raza	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo
Edad	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a
Procedencia	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo
Vacunación	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa
Vómitos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Diarrea	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Tipo de diarrea	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica
Muerte	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Nombre	Tomasa	S/N	Lobito	Pirata	S/N	Negrita	Rocket	William	Laika	Pirata
Sexo	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Macho
Raza	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo	Criollo
Edad	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	> 1a	3m	4m	3m
Procedencia	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Vacunación	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa	Incompleta	Incompleta	Incompleta
Vómitos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
Diarrea	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si
Tipo de diarrea	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	No Aplica	Líquida	Líquida	Líquida
Muerte	No	No	No	No	No	No	No	Desconocido	Desconocido	Desconocido
PCR CCV (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV1 (+)	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CBoV2 (+)	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
PCR CPV2 (+)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No